

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON
- MEDECINE -
U. E. R. ALEXIS-CARREL

Année 1980 - N° 266

**ACTIVITE
DES PROSTAGLANDINES INHIBITRICES
SUR L'AGREGATION PLAQUETTAIRE,
DANS LE DIABETE INSULINODEPENDANT.**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON
et soutenue publiquement le 26 Juin 1980
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Patrick BERCIAUD

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon

né le 30 Juillet 1954

à LYON 7° (Rhône)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554211_0004

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON

- MEDECINE -

U. E. R. ALEXIS-CARREL

Année 1980 - N° 266

ACTIVITE
DES PROSTAGLANDINES INHIBITRICES
SUR L'AGREGATION PLAQUETTAIRE,
DANS LE DIABETE INSULINODEPENDANT.

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

et soutenue publiquement le 26 Juin 1980

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Patrick BERCIAUD

Ancien Elève de l'Ecole du Service de Santé des Armées de Lyon

né le 30 Juillet 1954

à LYON 7^e (Rhône)

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON

- MEDICINE -

U. E. R. ALEXIS-CARRIEL

Année 1980 - N° 288

ACTIVITE
DES PROSTAGLANDINES INHIBITRICES
SUR L'AGREGATION PLAQUETTAIRE,
DANS LE DIABETE INSULINODEPENDANT.



THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON
et soutenue publiquement le 26 Juin 1980
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

Patrick BERCIAUD

Docteur en Médecine de l'École de Médecine de Saint-Etienne de Lyon

né le 30 Juillet 1954

à LYON 7^e (Rhône)

PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ : PROFESSEUR D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRÉSIDENT : PROFESSEUR M. DUFAY

DEUXIÈME VICE-PRÉSIDENT : M. J. C. DUPLAN

TROISIÈME VICE-PRÉSIDENT : MLE A. ECHALLON

SECRÉTAIRE GÉNÉRAL : M. J. RAMBAUD

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

ET LEUR DIRECTEUR

ALEXIS CARREL - PROFESSEUR R. MORNEX

GRANGE BLANCHE - PROFESSEUR ZECH P.

LYON NORD - DOCTEUR MINAIRE Y. (MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ)

SUD OUEST - PROFESSEUR NORMAND J.

=====

BIOLOGIE HUMAINE - DOCTEUR REVILLARD J. P. (MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ)

TECHNIQUES DE READAPTATION - PROFESSEUR MORGON A.

SCIENCES PHARMACEUTIQUES - PROFESSEUR BIZOLLON C. A.

SCIENCES ODONTOLOGIQUES - PROFESSEUR PARRET J.

INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE - M. MILLON A.

MATHEMATIQUES - PROFESSEUR PICARD P.

PHYSIQUE - PROFESSEUR DELMAU J.

CHIMIE ET BIOCHIMIE - MADAME VARAGNAT A. MAÎTRE ASSISTANTE

SCIENCES DE LA NATURE - PROFESSEUR LEMOIGNE Y.

SCIENCES PHYSIOLOGIQUES - MLE LE PROFESSEUR WORBE JEANNE-FRANÇOISE

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 1 - PROFESSEUR VILLE

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE N° 2 - PROFESSEUR GALLET DIRECTEUR ENSAM

OBSERVATOIRE - M. MONNET GUY - ASTRONOME ADJOINT

PHYSIQUE NUCLEAIRE - PROFESSEUR GUSAKOW M.

U. E. R. DE MECANIQUE - PROFESSEUR COMTE-BELLOT GENEVIÈVE

RESPONSABLES D'ENSEIGNEMENT
DE LA FACULTE ALEXIS CARREL

1^{ER} CYCLE :

ANATOMIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR ALAIN BOUCHET

HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE-BIOLOGIE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHRISTIAN GIROD

CHIMIE-BIOCHIMIE-STRUCTURALE : MONSIEUR LE DOCTEUR CLAUDE NOFRE

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

BIOCHIMIE MEDICALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-ANDRÉ BERTRAND

MATHEMATIQUES-STATISTIQUES : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN SITE

PHYSIOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL PELLET

MONSIEUR LE DOCTEUR MICHEL SCHMITT, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL BERGER

PSYCHOLOGIE MEDICALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN GUYOTAT

SCIENCES SOCIALES ET ECONOMIE MEDICALE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS ROCHE

2^{ÈME} CYCLE :

ANATOMIE PATHOLOGIQUE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL TOMMASI

MONSIEUR LE DOCTEUR ROBERT LOIRE, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

BACTERIOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN FLEURETTE

CANCEROLOGIE : MADAME LE DOCTEUR CHEIX

CARDIOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-PIERRE DELAHAYE

MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES BEAUNE, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

CHIRURGIE CARDIAQUE : MONSIEUR LE DOCTEUR GÉRARD CHAMPSAUR

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

CHIRURGIE DIGESTIVE : MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL MAILLET

CHIRURGIE INFANTILE : MONSIEUR LE DOCTEUR MAURICE DAUDET,

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

CHIRURGIE OSSEUSE-ORTHOPÉDIQUE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GEORGES DE MOURGUES

MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-JACQUES COMTET

CHIRURGIE VASCULAIRE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES DESCOTES

DERMATOLOGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR PERROT MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

ENDOCRINOLOGIE ET NUTRITION : MONSIEUR LE DOCTEUR FRANÇOIS BERTHEZENE
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

GASTRO-ENTEROLOGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS DESCOS
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

GENETIQUE GENERALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL HERMIER

GYNECOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR YVES ROCHET
MONSIEUR LE DOCTEUR ALAIN BREMOND , MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

HEMATOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN-JACQUES VIALA

HEMOBIOLOGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR DEHAVANNE MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

HYGIENE : MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN-CLAUDE MONIER MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

MALADIES INFECTIEUSES : MONSIEUR MAURICE GIROUD
PROFESSEUR AGRÉGÉ DU VAL DE GRÂCE

MEDECINE EXPERIMENTALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ MORNEX

MEDECINE LEGALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR LOUIS ROCHE

MEDECINE DU TRAVAIL : MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES BOURRET

NEPHROLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR BERNARD FRANCOIS

NEURO-CHIRURGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR GEORGES FISCHER
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
MONSIEUR LE DOCTEUR ROBERT DERUTY, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

NEUROLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MICHEL DEVIC
MONSIEUR LE DOCTEUR PAUL TROUILLAS, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

OBSTETRIQUE : MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ GARMIER

OPHTALMOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR MAURICE PAUPERT-RAVAULT

OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR HENRI MARTIN

PARASITOLOGIE : MADEMOISELLE LE DOCTEUR MADELEINE MOJON
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

PEDIATRIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ FRANCOIS
MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS DAVID , MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

PHARMACOLOGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN-CLAUDE EVREUX
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

PNEUMO-PHTISIOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR ROGER TOURAINÉ
MONSIEUR LE DOCTEUR JEAN-PIERRE BERNARD MAÎTRE DE CONFÉRENCES AG.

PSYCHOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JEAN GUYOTAT
MONSIEUR LE DOCTEUR MICHEL MARIE-CARDINE MAÎTRE DE CONFÉRENCES A

RADIOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR EDOUARD PINET
MONSIEUR LE DOCTEUR PIERRE BUFFARD, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS CHOLLAT, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

RHUMATOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE MEUNIER

SEMEIOLOGIE CHIRURGICALE : MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES VIGNAL

SEMEIOLOGIE MEDICALE : MONSIEUR LE DOCTEUR JACQUES ORGIAZZI
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

STOMATOLOGIE : MONSIEUR LE PROFESSEUR PIERRE DUMAS

THERAPEUTIQUE, REEDUCATION ET READAPTATION FONCTIONNELLE :
MONSIEUR LE DOCTEUR MICHEL EYSSETTE, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

TRAUMATOLOGIE CHIRURGIE GENERALE : MONSIEUR LE DOCTEUR GEORGES SPAY
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
MONSIEUR LE DOCTEUR ETIENNE TISSOT, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

URGENCE-REANIMATION : MONSIEUR LE PROFESSEUR RAYMOND DELEUZE
MADAME LE DOCTEUR SUZANNE ESTANOVE, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

UROLOGIE : MONSIEUR LE DOCTEUR PAUL PERRIN, MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ

=====

E X A M I N A T E U R S D E L A T H E S E .

Président : Monsieur le Professeur R. MORNEX

Assesseurs : Monsieur le Professeur J.J. VIALA

Monsieur le Professeur Agrégé P.A. BRYON

Monsieur le Professeur Agrégé M. DECHAVANNE.

A mes parents,

qui, par leur exemple, m'ont appris la valeur
et le bénéfice du travail, qui ont été le
support de mon orientation professionnelle et
d'efficaces auxiliaires spirituels dans les
phases les plus laborieuses de mes études.

A ma soeur,

A mon frère,

A toute ma famille.

A notre Maître et Président de thèse

Monsieur le Professeur MORNEX R.

qui nous fait le grand honneur de présider cette thèse.
Qu'il trouve ici, le témoignage de notre profond respect
et de notre reconnaissance.

Aux membres de notre jury

Monsieur le Professeur VIALA J.J.

qui m'a orienté sur ce travail. Nous le remercions
de sa confiance et lui témoignons notre gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé BRYON P.A.

Nous l'assurons de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé DECHAVANNE M.

Je le remercie tout particulièrement pour son accueil au
laboratoire en 1977. Ses qualités d'enseignant, son ouver-
ture d'esprit et sa disponibilité n'ont jamais failli.
Qu'il soit assuré du témoignage de mon profond respect et
de mon meilleur souvenir.

Je remercie,

Monsieur MICHEL LAGARDE, Docteur d'Etat es Sciences,

qui a été dans l'élaboration de ce mémoire, un atout indispensable par sa disponibilité et sa compétence. Je le remercie notamment de m'avoir enseigné les bases scientifiques, théoriques et pratiques, touchant au fonctionnement du laboratoire d'hémobiologie.

Mademoiselle MARTINE BURTIN, Technicienne,

Pour ses conseils et sa précieuse collaboration, et tous ceux, qui ont apporté directement leur contribution.

Mes amis et camarades d'Université,

Auprès de qui, j'ai trouvé confiance et bienveillance, en voulant bien servir de témoins pour les tests.

Monsieur le Docteur J.D. GRANGE et le Docteur B. GAUTHIER,

Pour leur efficacité dans la sélection des malades.

Monsieur le Docteur G. FOLLEA,

Pour son soutien et son aide précieuse.

A,

*Monsieur le Médecin Général Inspecteur THALABARD,
Commandant l'Ecole du Service de Santé des Armées.*

*Monsieur le Médecin chef des Services SEPETJAN,
Commandant en second de l'Ecole du Service de Santé
des Armées.*

*Monsieur le Médecin Principal HUGEUX,
Commandant la septième Compagnie.*

*Monsieur le Médecin Principal MARCOTTE,
Ancien Commandant de Compagnie à l'Ecole du
Service de Santé des Armées.*

*Le Major LABROUSSE, Sous-officier de la septième
Compagnie.*

PREAMBULE

Ce travail, réalisé au laboratoire d'hémobiologie de la Faculté Alexis Carrel sous la direction du Professeur Agrégé M. DECHAVANNE, fait partie d'un protocole subventionné par contrat I.N.S.E.R.M. (N° 008) dans le cadre d'une action spéciale de recherche N°5 intitulée : "détection des états préthrombotiques et prévention des thromboses" (aspects biochimiques, pharmacologiques, immunologiques, technologiques, épidémiologiques, y compris les études coût-efficacité).

Il a fait partiellement l'objet des communications suivantes :

- "communication orale lors de la XVIème rencontre du groupe d'étude sur l'hémostase et la thrombose. A Lyon, le 30 et 31 mars 1979, Faculté Alexis Carrel".
- "communication orale intitulée : Platelet prostaglandins and related compounds in Diabetes Mellitus. (M. LAGARDE and M. DECHAVANNE). Workshop : "Prostaglandins, Prostacyclin and thromboxanes measurement : Methodological problems and clinical prospects", organisée par la Communauté Européenne. A Nivelles (Belgique) le 15 et 16 novembre 1979".
- "communication écrite, intitulée : Platelet prostaglandins in Diabetes Mellitus. Acceptée pour publication dans Thrombosis Research.

TABLE DES MATIERES.

	Pages
INTRODUCTION	1
ABREVIATIONS	3
RAPPELS	5
I - RAPPELS SUR LA PLAQUETTE, METABOLISME DES PROSTAGLANDINES PLAQUETTAIRES, ET LA CELLULE ENDOTHELIALE	6
I - 1. LA PLAQUETTE	6
I - 1.1. Structure	6
I - 1.2. Principales fonctions plaquettaires	8
I - 1.3. Aspects biochimiques	11
I - 2. LE METABOLISME DES PROSTAGLANDINES PLAQUETTAIRES	14
I - 3. LA CELLULE ENDOTHELIALE	17
I - 3.1. Structure	18
I - 3.2. Physiologie	18
I - 3.3. Croissance et physiopathologie	19
I - 3.4. Interaction endothélio plaquettaire	19
I - 4. THEORIE DE LA BALANCE TXA_2 - PGI_2 (Moncada)	22
II - RAPPELS SUR LES COMPLICATIONS DEGENERATIVES DU DIABETE	24
II - 1. CLASSIFICATION	24
II - 1.1. La macroangiopathie	24
II - 1.2. La microangiopathie	24
II - 2. PATHOGENIE	27
II - 2.1. Perturbations vasculaires	28
II - 2.2. Perturbations sanguines	28
III - POSITION DU SUJET	36
BASES DE TRAVAIL	37
I - INTRODUCTION AU TRAVAIL	38
II - SELECTION DES MALADES ET DES TEMOINS	40
II - 1. SELECTION DES MALADES	40
II - 2. SELECTION DES TEMOINS	40
III - MATERIELS ET METHODES.....	42
III - 1. CIRCONSTANCES DU PRELEVEMENT	42
III - 2. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE	42
III - 3. DESCRIPTION TECHNIQUE DU MATERIEL D'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE	47
III - 4. REACTIFS UTILISES	47

III - 5. DEFINITIONS DE LA DOSE MINIMALE AGREGANTE	
ET DU POURCENTAGE D'INHIBITION	49
III - 6. EXPLOITATION STATISTIQUE	50
RESULTATS	52
I - ETUDE ANALYTIQUE	53
I - 1. OBSERVATION DES MALADES	53
I - 2. RESULTATS DE L'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE	
CONCERNANT LES COUPLES MALADE-TEMOIN.....	66
I - 2.1. Doses minimales agrégantes	66
I - 2.2. Action de la PGI_2 sur l'activité	
plaquettaire	66
I - 2.3. Action des microsomes sur l'activité	
plaquettaire	66
I - 2.4. Action de la PGD_2 et de la PGE_1 sur	
l'activité plaquettaire	67
I - 3. ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EFFET PLAQUETTAIRE	
DE L'INSULINE	67
II - SCHEMA ET TABLEAUX RECAPITULATIFS DES RESULTATS	71
III - COMMENTAIRES	81
IV - AUTRES RESULTATS DU PROTOCOLE CONCERNANT LES DIABETIQUES	82
DISCUSSION	83
CONCLUSIONS	90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93

INTRODUCTION .

Le diabète sucré est une maladie fréquente, touchant environ 2% de la population (diabètes insulino et non insulino-dépendants).

De multiples facteurs ont été envisagés et étudiés dans le but d'élucider la nature des complications dégénératives qui font la gravité de cette affection, en représentant la principale cause d'invalidité et de mortalité des diabétiques. Ces complications dépendent de lésions vasculaires conditionnées par des processus thrombosants surajoutés.

Le rôle des plaquettes dans la formation du thrombus est bien connu, mais l'intérêt de son étude résulte de l'essor récent des connaissances sur les prostaglandines.

Ce travail consistera dans un premier temps à faire un rappel sur la physiologie plaquettaire, et sur les complications dégénératives du diabète en envisageant les principales hypothèses pathogéniques. Nous justifierons notre étude qui se bornera par souci d'homogénéité au diabète insulino-dépendant.

Dans un deuxième temps, on détaillera les bases de travail et les résultats, qui conduiront à une discussion.

ABBREVIATIONS.

ADP = Adenosine 5' diphosphate.

AMPc = Adenosine 3' 5' monophosphate cyclique.

ATP = Adenosine 5' triphosphate.

Ca⁺⁺ = Calcium.

GH = Growth hormone = hormone de croissance.

Mg²⁺ = Magnésium.

PG = Prostaglandine.

PGI₂ = Prostacycline.

PPP = Plasma pauvre en plaquettes.

PRP = Plasma riche en plaquettes.

PRPc = Plasma riche en plaquettes citraté

TXA₂ = Thromboxane A₂.

RAPPELS

I - RAPPELS SUR LA PLAQUETTE, LE METABOLISME DES PROSTAGLANDINES PLAQUETTAIRES, ET LA CELLULE ENDOTHELIALE.

I - 1. LA PLAQUETTE

I - 1.1. STRUCTURE : SCHEMA 1.

La plaquette est une cellule anuclée, discoïde au repos, de 2 μm de diamètre provenant de la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elle est constituée :

- D'une membrane plasmique très riche en lipides (70 à 80% de son poids est constitué de phospholipides) (140). Différentes glycoprotéines rentrent également dans sa composition et joueraient le rôle de récepteur.

Sa surface est le siège de nombreuses invaginations formant le système canaliculaire ouvert, permettant l'expulsion des granules lors de l'excrétion (ou "release").

- D'organites intracellulaires.

En microscopie électronique, on peut distinguer :

§ 2 sortes de granules (granules denses, granules α et lysosomes).

Les granules denses (en microscopie électronique) contiennent : ATP, ADP, sérotonine, pyrophosphate, calcium, magnesium.

Les granules α , moins denses aux électrons et de taille supérieure, contiennent :

- Du potassium.
- Le facteur plaquettaire 4, protéine douée d'une activité neutralisante sur l'héparine (21).
- La β -thromboglobuline possédant également une activité antihéparine (189).
- Un facteur mitogène favorisant la multiplication des cellules musculaires lisses (166).
- Des antiprotéases (antitrypsine, antiplasmine) et facteurs de la coagulation (21).

Les lysosomes, peu différents, se distinguent par leur richesse en hydrolases acides.

§ Un système tubulaire dense : membranes intracellulaires, capables d'accumuler du calcium.

§ Des mitochondries peu nombreuses.

§ Des grains de glycogène, réserve énergétique de la plaquette.

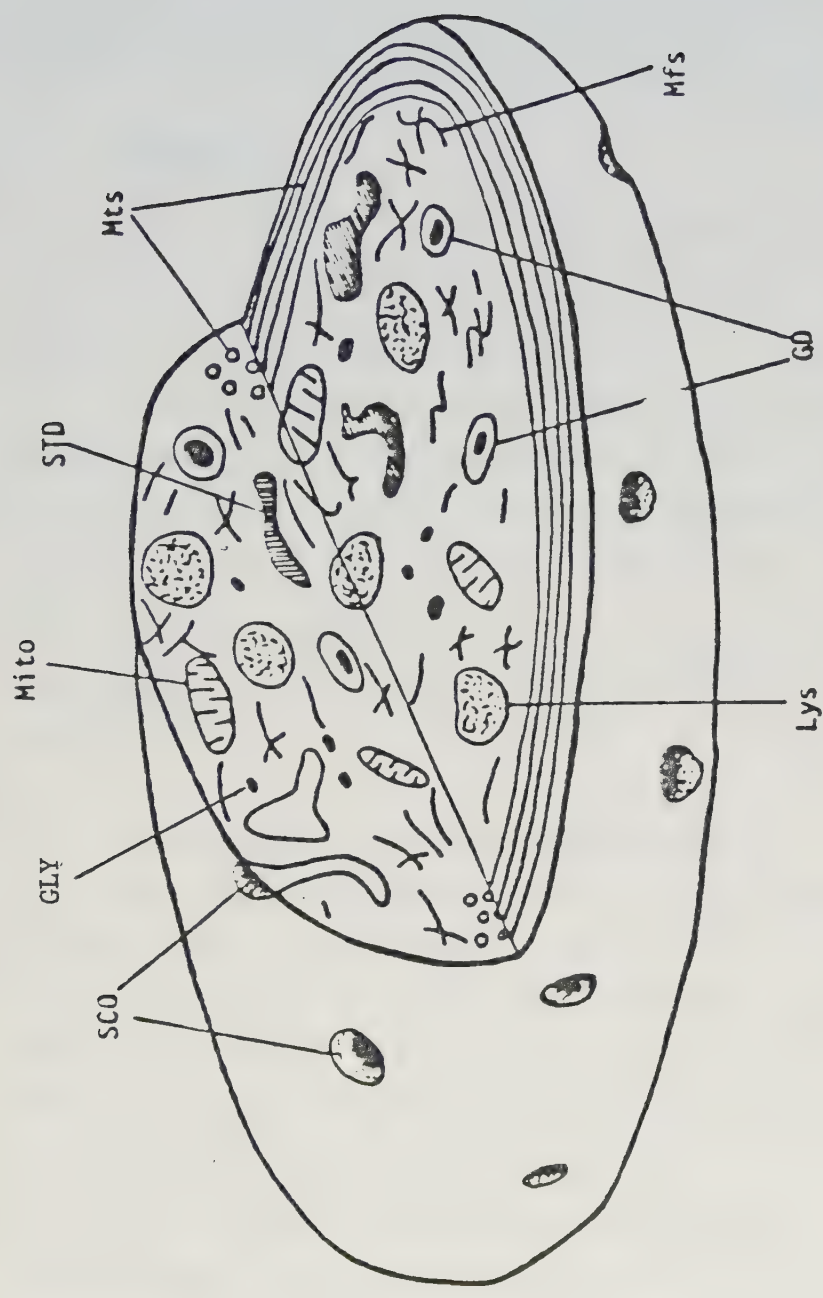


Schéma 1. PLAQUETTE EN COUPE SUIVANT DEUX PLANS PERPENDICULAIRES (D'APRES CRAWFORD ET TAYLOR) .

- De microfilaments, et d'un réseau de microtubules qui interviendraient dans le maintien de la morphologie.

I - 1.2. PRINCIPALES FONCTIONS PLAQUETTAIRES (SCHEMA 2.)

Les différents temps de l'activation plaquettaire n'admettent pas de chronologie bien précise. Aussi les étapes suivantes de l'hémostase primaire, habituellement séparées pour un problème didactique, peuvent-elles être intriquées.

L'adhésion.

Les plaquettes ont la propriété d'adhérer au verre et au collagène (97, 100). Dans l'organisme normal, tout se passe comme s'il existait entre la plaquette et la paroi vasculaire des forces de répulsion, les plaquettes n'adhérant jamais à un endothélium normal (63, 159).

Lorsqu'il existe une brèche vasculaire, les plaquettes sont capables d'adhérer aux structures sous endothéliales (8) grâce à la présence de collagène et de microfibrilles au niveau du vaisseau, de glycoprotéine I au niveau de la plaquette (217), riche en acide sialique et absente dans la dystrophie thrombocytaire hémorragipare de Bernard Soulier.

Cette adhésion va conduire à la formation d'agrégats plaquettaires, et au déclenchement de la coagulation intrinsèque par activation du facteur XI plasmatique (231).

L'excrétion ou "release plaquettaire".

Cette phase correspond à l'exocytose des composés granulaires, grâce au système canaliculaire ouvert.

La libération des deux types de granules, est pour Holmsen, dépendant d'un mécanisme différent selon qu'il s'agit des granules denses (release I) ou α (release II), chaque type de "release" ayant sa propre cinétique (92).

La thrombine serait capable d'induire les deux types de release. L'ADP, seulement le type I.

L'excrétion des granules, sous la dépendance de thrombosthénine s'accompagne de modifications morphologiques avec perte de leur forme discoïde (18) probablement due à la disparition des microtubules, pour devenir sphérique avec apparition de pseudopodes et organisation concentrique des granules avant l'expulsion. Le rôle de la mobilisation du calcium intracellulaire et des réserves d'énergie sous forme d'ATP, serait particulièrement important.

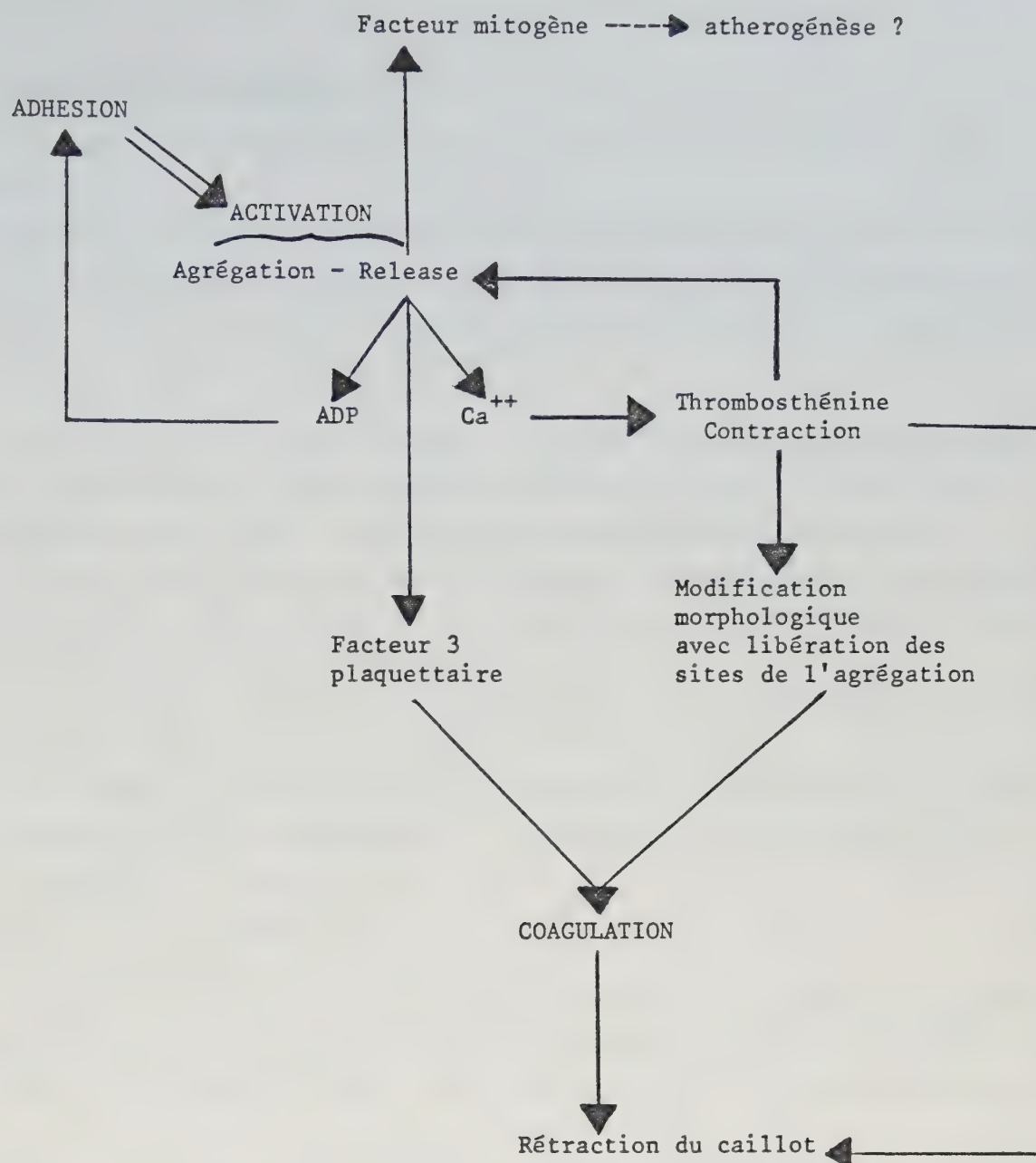


Schéma 2. PRINCIPALES FONCTIONS PLAQUETTAIRES.

L'agrégation plaquettaire.

Il s'agit d'une combinaison interplaquettaire par l'intermédiaire des pseudopodes.

De nombreux inducteurs peuvent déclencher ce phénomène in vitro. Nous citerons les principaux avec un aperçu de leur mode d'action qui, initialement mis sur le seul compte d'une excrétion d'ADP endogène, s'avère en fait plus complexe et dans certains cas encore hypothétique.

- L'ADP (4, 75). Il peut provoquer selon les doses des agrégations réversibles ou irréversibles, avec le phénomène de double vague. Il agirait par transformation en ATP grâce à une nucléoside diphosphokinase membranaire.

- L'acide arachidonique emprunte la voie des prostaglandines pour aboutir en particulier aux endopéroxydes de prostaglandines et au thromboxane A_2 , capables de provoquer l'agrégation plaquettaire (194).

- Le collagène. Il agit de façon prédominante par la biosynthèse des prostaglandines et de façon moindre par l'ADP excrété (114, 185).

- La thrombine. Elle activerait la plaquette par le biais de trois voies :
 § La libération d'acide arachidonique des phospholipides membranaires (16), et donc la synthèse de thromboxane A_2 .

§ L'excrétion d'ADP endogène (172).

§ Autre voie mal connue (172).

- D'autres agents sont susceptibles de provoquer l'activation plaquettaire : l'adrénaline (44), la sérotonine (7), la ristocetine par un processus physique (98), les complexes immuns (175), les acides gras à forte concentration (179).

L'ADP, la sérotonine, et les acides gras, ont un faible pouvoir de libération des composés granulaires.

La voie finale commune de ces modifications serait représentée par la mobilisation du Ca^{++} au niveau du système tubulaire dense, le mettant ainsi à la disposition du cytoplasme pour l'activation d'un système contractile (130, 142).

En plus de cette activation dynamique, la plaquette acquiert là aussi des activités procoagulantes, notamment en fournissant un complexe lipoprotéique à phospholipides "le facteur 3 plaquettaire" qui dépend de la disponibilité des phospholipides membranaires inaccessibles sur la plaquette non activée. Ce facteur va intervenir dans l'activation du facteur X plasmatique et surtout dans la formation de la prothrombinase ou thromboplastine (57). La plaquette possède aussi

l'aptitude à activer le facteur XII après stimulation par l'ADP.

L'agrégation plaquettaire semble mettre en jeu des sites membranaires représentés par un groupe de glycoprotéines (IIb/IIIa) comme le laisse supposer d'une part les études effectuées dans la thrombasthénie de Glanzmann ou l'agrégation est nulle, d'autre part l'inhibition de celle-ci par des anticorps spécifiques de ces sites (27, 28).

Outre le côté pathologique, il existe de nombreux moyens pharmacologiques ou physiologiques pour inhiber les fonctions plaquettaires, agissant par deux grands moyens :

- En augmentant le taux d'AMPc (dipyridamole, prostacycline)
- En entravant la biosynthèse des prostaglandines (acide acetyl salicylique).

La rétraction du caillot

Une fois l'activation plaquettaire enclenchée, par exemple au contact d'une lésion vasculaire, l'agrégat formé va être pris en masse par la fibrine insoluble provenant de la coagulation plasmatique, et constituer ainsi un caillot. La rétraction de celui-ci, phénomène tardif et lent, serait sous la dépendance de la thrombosthénine (130).

II - 1.3. ASPECTS BIOCHIMIQUES (SCHEMA 3. 4.)

Nous avons déjà souligné l'importance des récepteurs glycoprotéiques membranaires à l'occasion de l'étude des fonctions plaquettaires.

Cette petite cellule semble effectivement pouvoir interférer avec de nombreuses substances, grâce à des sites au niveau de la membrane, lui conférant une grande susceptibilité, d'autant plus qu'il s'agit d'un élément figuré circulant pouvant entrer en contact rapidement avec toute molécule, celle-ci se trouvant à un stade quelconque de son métabolisme.

S'il existe probablement encore de nombreuses inconnues dans ce domaine, un regain d'intérêt a été apporté récemment par la découverte de récepteurs plaquettaires à l'insuline (223). Un aperçu de l'effet de l'insuline sur les plaquettes sera donné dans un chapitre suivant.

Par ailleurs, comme dans de nombreuses autres cellules, on soulignera l'importance de l'AMPc, que l'équipe de Sutherland a rapporté comme étant un messager ubiquitaire (26). Il est le résultat de la transformation de l'ATP par une enzyme membranaire l'adenylate cyclase (192, 193), et est catabolisé en

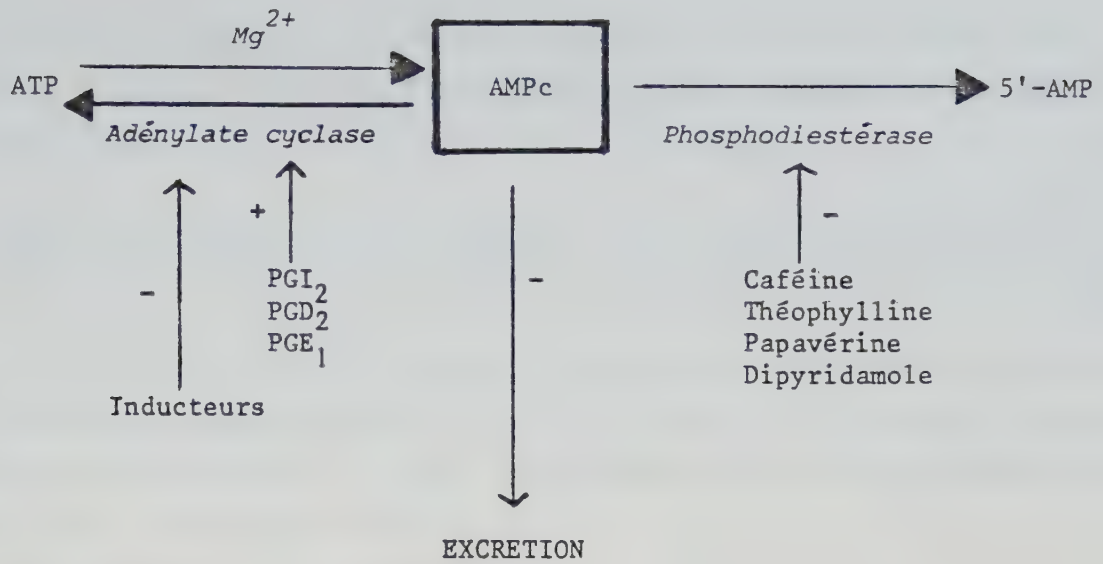


Schéma 3. ROLE CENTRAL DE L'AMPc PLAQUETTAIRE.

+ = Stimulation.

- = Inhibition.

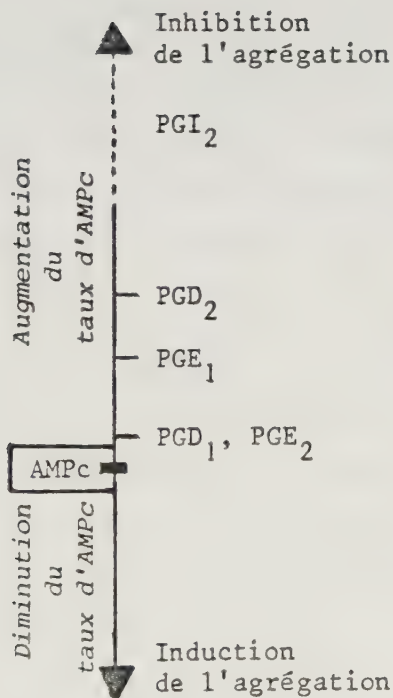


Schéma 4. ECHELLE D'ACTIVITE DES PROSTAGLANDINES INHIBITRICES DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE.

5' AMP grâce à la phosphodiesterase cytoplasmique pour certains (207), pour d'autres il existerait deux phosphodiestérases, l'une cytoplasmique, l'autre membranaire (3).

Grâce à l'adénylate cyclase d'une part et à la phosphodiesterase d'autre part, son taux peut être régulé. Celui-ci peut aussi être influencé par différents inducteurs ou inhibiteurs :

- Les inducteurs font habituellement diminuer le taux d'AMPc intraplaquettaire en inhibant l'adényl cyclase (48, 118, 192, 239) ; La thrombine produirait au contraire une diminution de l'AMPc, immédiatement suivie d'une augmentation peut-être sous la dépendance de PGE (119).

- Les inhibiteurs eux, augmentent le taux d'AMPc par action sur la phosphodiesterase pour certains comme la caféine, la théophylline, la papaverine, le dipyridamole (94), par activation de l'adénylate cyclase pour d'autres comme certaines prostaglandines (PG). On a reconnu très tôt ce rôle sur l'adénylate cyclase à la PGE₁ (237), plus tard à la PGD₂ (145, 146), plus puissante que la PGE₁ (205). Le rôle de PGH₁ et PGD₁ est bien moindre (146), alors que les PGF α ont une très faible activité. La PGE₂ présente une inhibition de l'adénylate à faible dose et une activation aux doses plus fortes. Depuis récemment il est admis que la prostacycline (PGI₂) est le plus fort activateur de l'adénylate cyclase (73).

Le rôle messager de l'AMPc se résoud donc en une inhibition de l'activation plaquettaire. Celui-ci s'effectuerait d'abord en s'opposant à la libération d'acide arachidonique sous l'action de certains inducteurs (124, 148), puis activerait la phosphorylation d'une protéine kinase qui deviendrait alors capable de chasser le calcium cytoplasmique au profit du système tubulaire dense (83, 112).

Un autre aspect important de la membrane plasmique est représenté par sa composition lipidique. En effet les phospholipides inclus dans celle-ci sont le réservoir d'acides gras insaturés, particulièrement l'acide arachidonique qui joue un grand rôle dans le déclenchement de la biosynthèse des prostaglandines plaquettaires, et donc dans l'activation plaquettaire. La plus grande partie de l'acide arachidonique est estérifiée aux phospholipides membranaires (34, 139), une faible quantité est présente dans la plaquette sous forme libre (139).

De nombreux agents agrégants tels que le collagène, la thrombine et d'autres, vont déclencher la libération de l'acide arachidonique estérifié aux phospholipides membranaires grâce peut-être à l'existence d'une phospholipase A₂ dont l'existence n'a pu être clairement démontrée.

Une fois libéré, il va pouvoir être engagé dans deux voies enzymatiques parallèles, dont l'une conduira à un dérivé de prostaglandines particulièrement

important : le thromboxane A_2 .

I - 2. LE METABOLISME DES PROSTAGLANDINES PLAQUETTAIRES.

Il sera illustré par les schémas 5, 6, 7, 8.

Bien que la découverte d'un principe actif dans la prostate date de 1913 (Batez et Boulet), auquel Von Euler donna le nom de prostaglandine en 1935, ce n'est qu'en 1960-1963 que Bergström, en Suède, parvint à isoler et à analyser chimiquement les premières molécules.

Depuis, les études sur les prostaglandines se sont multipliées en biochimie, en physiologie, en physiopathologie et récemment en pathologie, comme substance thérapeutique.

Les prostaglandines (PG) sont des acides gras composés de 20 atomes de carbone, cycliques, polyoxygénés, insaturés et solubles, dont le squelette de base se réfère à une molécule hypothétique, l'acide prostanoïque (Schéma 5). Ces substances ubiquitaires sont douées à doses infimes d'un fort pouvoir biologique. Elles peuvent dériver de trois acides gras insaturés :

- L'acide 8, 11, 14, eicosatrienoïque ou acide dihomogammalinolénique, qui est un anti agrégant plaquettaire peut-être par sa transformation en PGE_1 (235). Cet acide va être à l'origine des prostaglandines de la série 1 (1 double liaison).

- L'acide 5, 8, 11, 14, eicosatetraenoïque ou acide arachidonique, qui lui, induit comme nous l'avons vu l'agrégation. Cet acide, va être à l'origine des prostaglandines de la série 2 (deux doubles liaisons).

- L'acide 5, 8, 11, 14, 17, eicosapentaenoïque. Cet acide va être à l'origine des prostaglandines de la série 3 (trois doubles liaisons). Chaque famille de prostaglandines, définie par des particularités structurales, est désignée par une lettre majuscule (PGA, PGB ... PGI).

Au niveau de la plaquette, les données concernant la biosynthèse des prostaglandines et produits apparentés sont récentes (203, 204), et la plupart sont relatives à l'oxygénation de l'acide arachidonique.

L'utilisation de l'acide dihomogammalinolénique semble cependant assez différente de celle de l'acide arachidonique (58), donnant naissance à la PGE_1 , PGD_1 , $PGF_1\alpha$, HHT et MDA. Le TXB_1 n'est en effet formé qu'en très faible quantité.

L'acide arachidonique va subir des réactions enzymatiques :

§ Grâce à une cyclooxygénase il va se transformer en endoperoxydes cycliques de prostaglandines, intermédiaires labiles (durée de vie de 5 minutes dans les

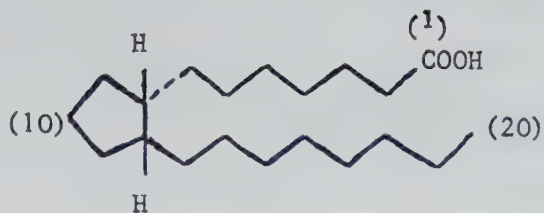


Schéma 5 : ACIDE PROSTANOIQUE : MOLECULE HYPOTHETIQUE DE REFERENCE DES PROSTAGLANDINES.

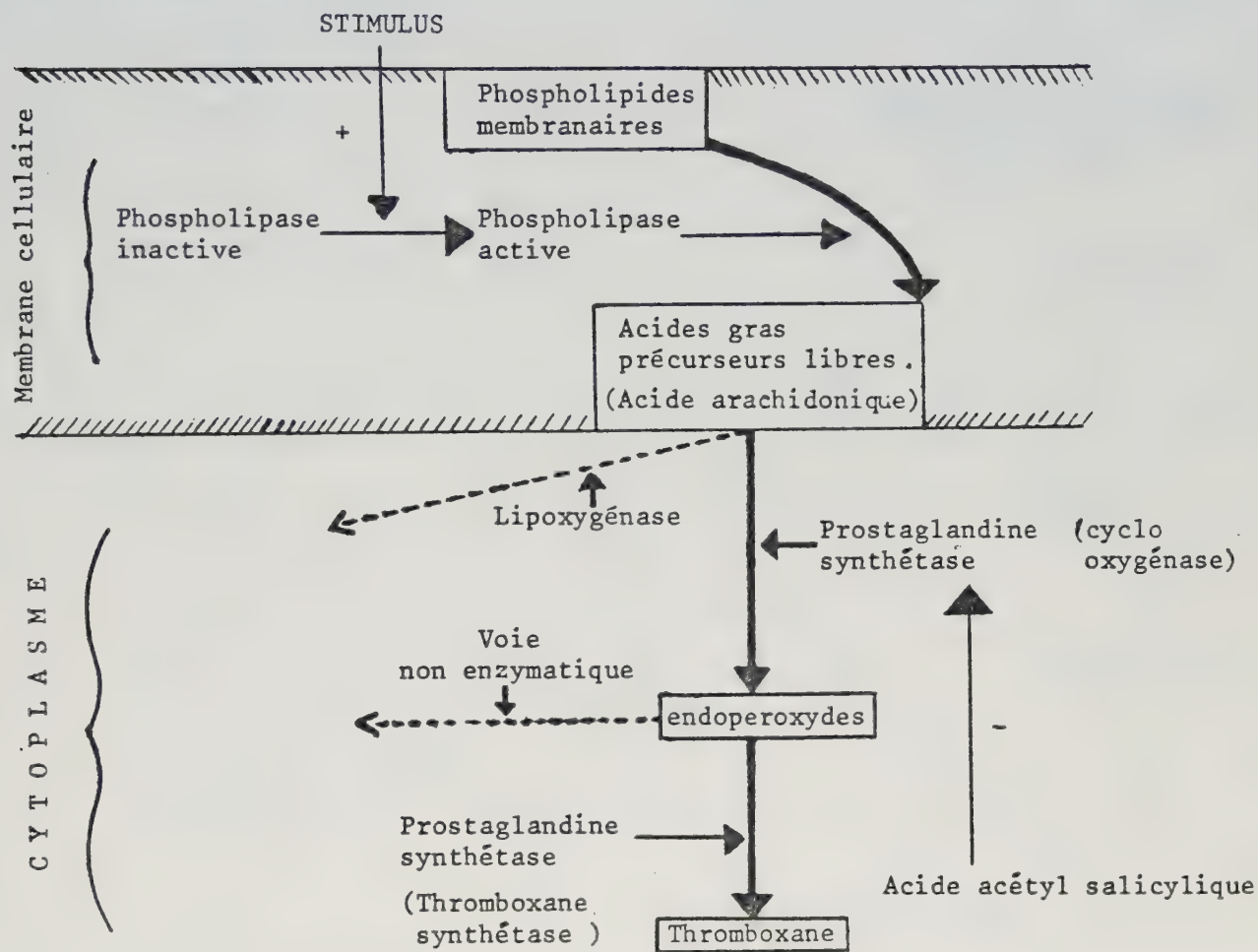


Schéma 6 : VOIE D'ACTIVATION DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE PAR LA PG SYNTHETASE, DANS LA PLAQUETTE.

+ = Stimulation.

- = Inhibition.

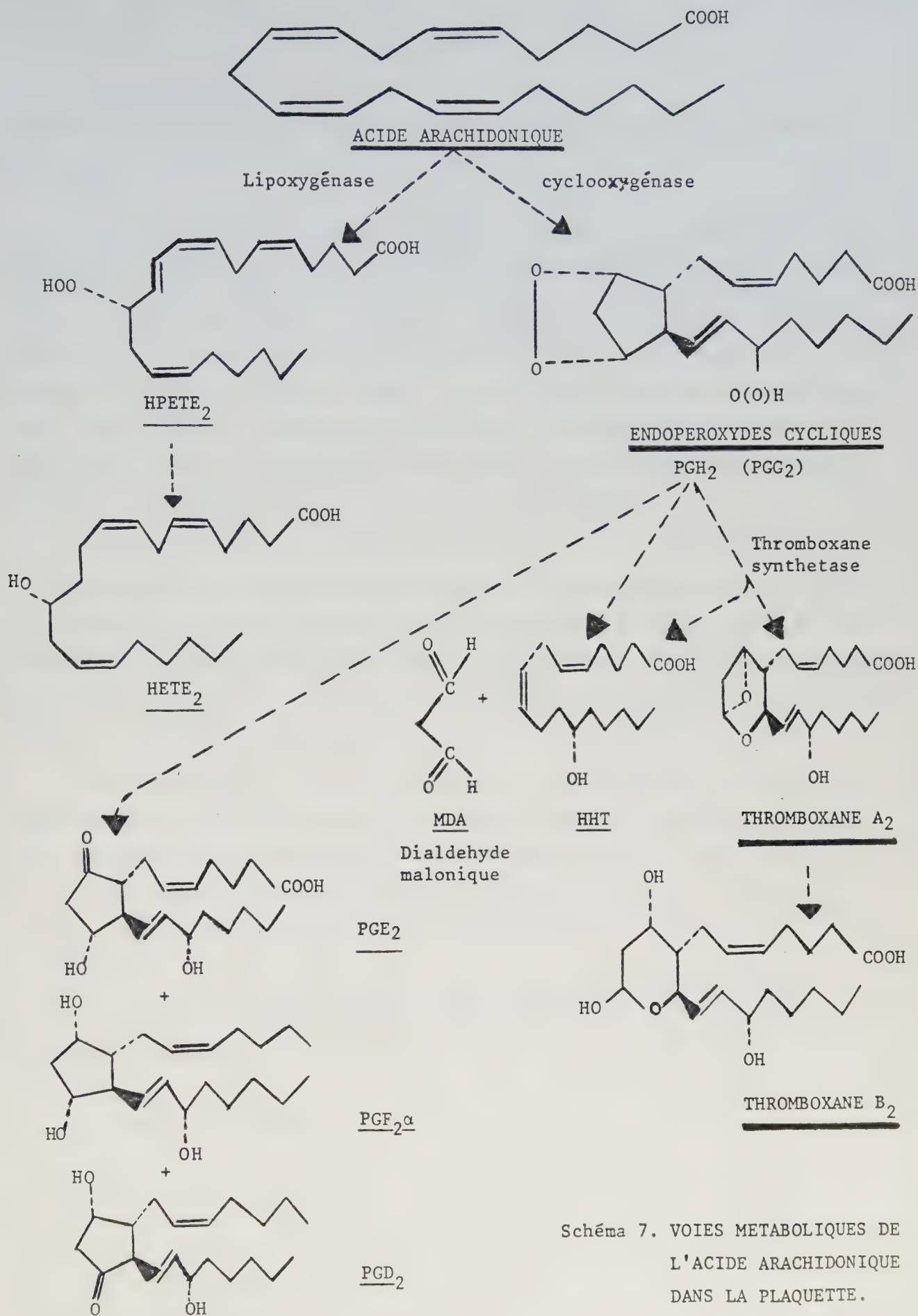


Schéma 7. VOIES METABOLIQUES DE
L'ACIDE ARACHIDONIQUE
DANS LA PLAQUETTE.
(D'APRES SAMUELSSON ET
AL).

conditions physiologiques), capables de provoquer l'agrégation et l'excrétion (78, 79, 80).

Dès lors plusieurs voies sont possibles (schéma 7). Les endoperoxydes sont transformés à leur tour, grâce à la thromboxane synthétase, en thromboxane A_2 , composé très labile (demi-vie d'environ 30 secondes à 37°C dans un tampon sans protéines) mais très puissant inducteur des fonctions plaquettaires (81), et qui possède en outre une action vasoconstrictrice (162). Le mode d'action de ce composé serait inverse de celui de l'AMPc, en favorisant le passage calcique du système tubulaire dense au cytoplasme plaquettaire, activant de cette façon le système contractile et l'excrétion plaquettaire, en même temps qu'il se transformerait en thromboxane B_2 (69), inactif sur les plaquettes.

D'autres produits sont également formés : MDA, HHT, PGE_2 , PGD_2 , PGF_2 .

L'ensemble de ces enzymes regroupées sous le nom de prostaglandine synthétase, peut être le siège d'inhibition par des molécules variées comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (acide acetyl salicylique...) (234), les antioxydants (Vit E) (224). Ce complexe enzymatique est localisé principalement au niveau des "microsomes" représentés essentiellement par le système tubulaire dense (68).

§ L'acide arachidonique peut également servir de substrat à une autre réaction catalysée par la lipoxigénase, enzyme située dans la fraction microsomique (91), conduisant à un hydroperoxyde d'acide arachidonique (12-HPETE), instable et inhibiteur de la thromboxane synthétase (82) puis à l'acide 12-hydroxy-5, 8, 10, 14, eicosatetraenoïque (12-HPETE), produit stable doué d'une activité chimiotactique (221).

Le schéma 7 résume ces transformations à partir de l'acide arachidonique (il ne montre pas la synthèse d'acides gras trihydroxylés par la lipoxigénase, découverte récemment par Bryand)(22).

I - 3. LA CELLULE ENDOTHELIALE

L'étude de celle-ci n'est pas réalisable dans le cadre de ce travail ; Aussi le lecteur pourra se référer à d'excellentes revues générales (141, 214).

La paroi artérielle d'un vaisseau est composée de trois tuniques :

- L'intima (endothélium + sous endothélium), formée :

§ D'une monocouche de cellules endothéliales en contact direct avec la circulation sanguine.

§ D'un sous-endothélium comprenant la membrane basale, du collagène,

élastine et microfibrilles.

- La média, formée de cellules musculaires lisses (les médiacytes).
- L'adventice, surtout pourvu du tissu conjonctif.

C'est la cellule endothéliale qui nous retiendra ici, du fait de son importance dans les phénomènes de coagulation.

Ces cellules d'aspect pavimenteux bordent la lumière vasculaire, dans le sens parallèle au flux sanguin dont elles maintiennent la fluidité.

I - 3.1. Structure

La cellule endothéliale est une cellule allongée présentant des projections bien visibles en microscopie électronique. Outre les organites intracellulaires habituels, elle présente des marqueurs spécifiques : Les corps de "Weibel-Palade". Elle est recouverte d'un glycocalix, complexe glucidolipidoprotéique, riche en acide sialique, qui jouerait un rôle important dans la thromborésistance.

On a pu mettre en évidence par immunofluorescence, un système antigénique du groupe ABO et HLA sur la surface de la cellule (70, 104).

Par ailleurs, elle posséderait des récepteurs à diverses molécules (72, 89) : LDL, insuline, hormones, et notamment l'héparine. Il existerait 10^6 molécules d'héparine environ liées à chaque cellule.

Les jonctions intercellulaires seraient de deux types : lâches au niveau des artères, les jonctions serrées prédominent au niveau des veines.

I - 3.2. Physiologie

§ La cellule endothéliale joue tout d'abord un rôle particulièrement important dans les échanges entre le sang et les tissus, qui peuvent s'effectuer soit à travers la cellule (Pinocytose...) soit par les jonctions intercellulaires après contraction des cellules endothéliales grâce à ses fibres d'actine et de myosine. Ainsi, en dehors de toute lésion, la cellule endothéliale peut transporter des protéines plasmatiques, des bactéries, des virus, et même des plaquettes (108, 115, 131).

Pour certains les éléments figurés du sang seraient capables d'emprunter un passage au niveau de la jonction cellulaire.

§ Un autre aspect important est son rôle dans la coagulation :

- Un rôle positif grâce aux activateurs tissulaires libérés lors de la destruction cellulaire, à la synthèse de facteur VIII Willebrand (99, 103),

de thromboplastine et d'inhibiteurs de l'activation du plasminogène.

- Rôle négatif, passif d'une part, par la nature même de la surface cellulaire (glycosalyx) (56, 232), actif d'autre part, grâce à la synthèse d'activateurs du plasminogène (133, 219) et d'antithrombine III, à la libération possible d'héparine liée à la surface cellulaire ou à son activation par la combinaison in "situ" avec l'antithrombine III, à la présence d'une ADP ase membranaire, et à la synthèse de prostaglandines inhibitrices de l'activation plaquettaire : PGE (54, 111), et surtout PGI (149, 152, 153).

§ La cellule endothéliale intervient dans le transport et le métabolisme de la bradykinine et de la sérotonine (202). Elle possède l'enzyme de conversion de l'angiotensine I, peut capter le facteur II et X activés, et enfin peut synthétiser du glycogène et les composés du sous endothélium (collagène type IV, microfibrilles, élastine, mucopolysaccharides).

I - 3.3. Croissance et physiopathologie.

La possibilité de pratiquer des cultures de cellules endothéliales a multiplié les recherches dans ce domaine, d'où une meilleure connaissance de la physiologie et de la physiopathologie. Après avoir créé une lésion sur le revêtement endothélial, par un mécanisme physique, mécanique ou encore chimique, il est possible d'observer en microscopie électronique le comportement des cellules endothéliales : les cellules lésées vont subir des modifications (contraction, vacuolisation) et se détacher de la paroi vasculaire, alors que les cellules avoisinant la lésion vont émettre des prolongements afin de diminuer la surface sous endothéliale en contact avec le sang (131). Les plaquettes vont aussi jouer un rôle en venant rétablir la continuité vasculaire au niveau de la lésion et en libérant un facteur de croissance (25, 215).

La régénération serait donc possible (71) et selon Malczak et Buck elle serait, pour des cellules de rat, de 590 $\mu\text{m}/\text{j}$. (137).

Les glucocorticoïdes, et notamment la dexaméthasone accélèreraient ce processus de croissance et de régénération cellulaire (132). Dans un milieu hyperosmolaire, hyperglycosé, la multiplication des cellules serait ralentie.

I - 3.4. Interaction endothélio plaquettaire (Schéma 8).

Un véritable système endothélioplaquettaire semble être en place pour

réguler l'activation plaquettaire et assurer l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

Outre les interactions décrites ci-dessus, ce système fait appel aux prostaglandines et produits dérivés de découverte récente.

Nous avons déjà insisté sur la formation d'endoperoxydes et de thromboxane (78, 79, 80, 194, 195) dans la plaquette ayant une activité agrégante surtout en ce qui concerne le thromboxane (TXA₂) qui possède une activité puissante.

La cellule endothéliale, elle, est capable de synthétiser une prostaglandine cyclique, initialement appelée PGX (74, 149), actuellement notée PGI₂. Cette substance a la propriété d'entraîner, à la différence du TXA₂, un relâchement des muscles lisses et donc une vasodilatation. C'est également le plus puissant anti-agrégant plaquettaire connu jusqu'à ce jour (151).

Biosynthèse de PGI₂

Elle se réalise grâce à la prostacycline synthétase, enzyme microsomique, qui semble assez spécifique de l'endothélium (134, 152, 233) où elle serait environ dix fois plus concentrée que dans le reste de la paroi artérielle. Il a d'abord été montré que les microsomes de la paroi vasculaire pouvaient synthétiser la PGI₂ à partir des endoperoxydes cycliques de prostaglandines (149), puis plus tard, à partir de l'acide arachidonique (23). La part respective de l'utilisation préférentielle de celui-ci par rapport aux endoperoxydes reste discutée (134, 163), mais il semble bien exister un passage des endoperoxydes de la plaquette au niveau de la cellule endothéliale (157) (schéma 8).

Pour McIntyre, la production de PGI₂ serait surtout le fait d'un facteur plasmatique, labile, non dialysable, et présent après congélation du plasma (134).

La synthèse de PGI₂, peut être spécifiquement inhibée par un hydroperoxyde l'acide 15-hydroperoxy arachidonique (15-HPAA, actuellement noté 15-HPETE), et peut être de façon moins spécifique par une molécule pharmaceutique : la tranylcipronine (181).

L'acide acetyl salicylique peut inhiber la formation de PGI₂ à partir de l'acide arachidonique, ce qui suggère l'existence d'une cyclooxygénase, mais les doses inhibitrices nécessaires sont environ 7 à 8 fois plus élevées que pour la cyclooxygénase plaquettaire (168).

Structure, mode d'action, catabolisme

La structure a été rapportée par Johnson. La partie importante de la molécule

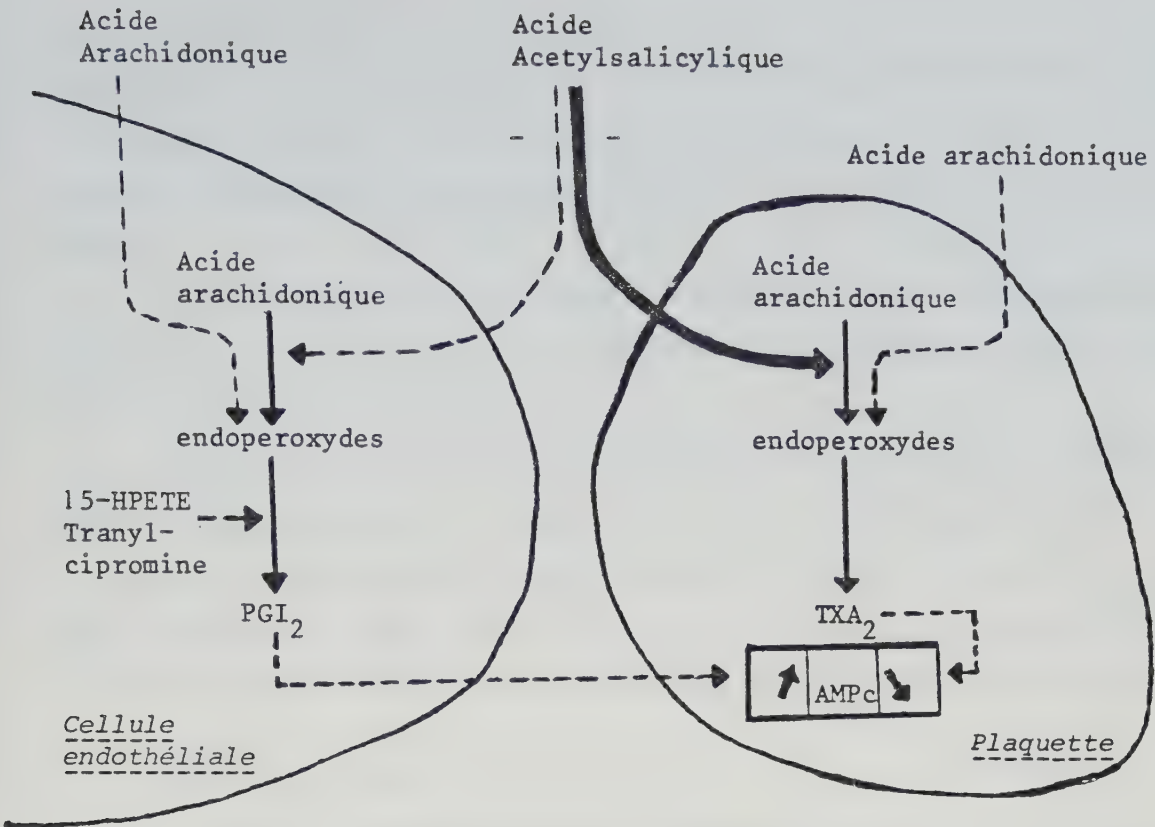


Schéma 8. INTERACTION ENDOTHELIOPLAQUETTAIRE (D'après MONCADA).

↑ = Augmentation.
↓ = Diminution.
- = Inhibition.

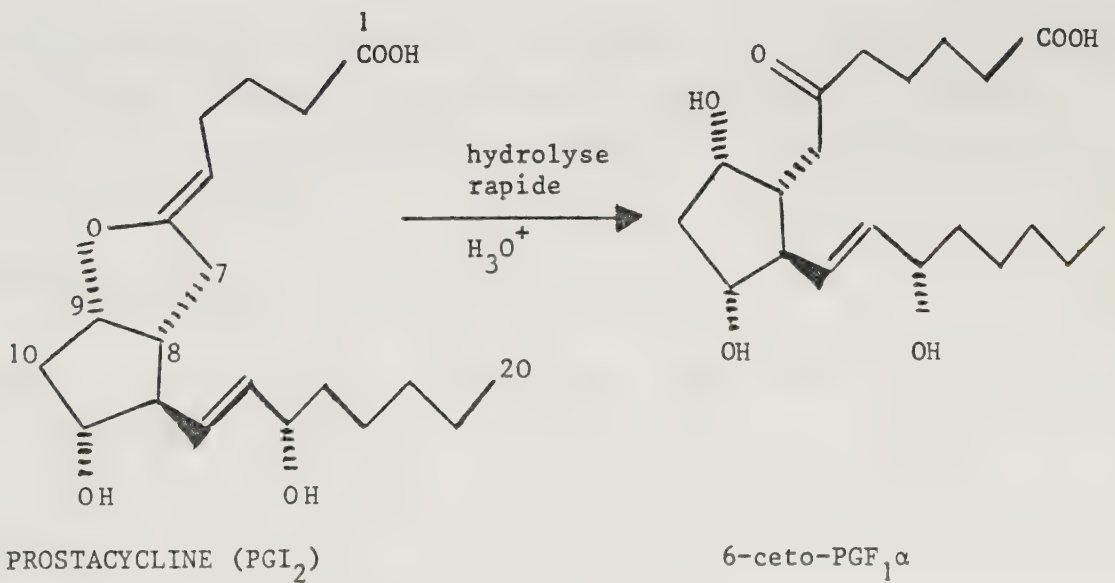


Schéma 9. HYDROLYSE DE LA PGI₂ EN 6-ceto-PGF_{1α}.

serait représentée par le groupe vinyl ether, entre les carbones 5 et 6, et l'atome d'O₂ sur le carbone 9.

La PGI₂ agirait par l'intermédiaire d'un récepteur sélectif (200) sur la membrane plaquettaire en augmentant l'AMPc, à la différence du TXA₂ qui le diminue.

La prostacycline est une molécule instable (demi-vie d'environ 10 minutes à pH 7,6, à 25°C) (33) ; Dans les conditions physiologiques sa demi-vie serait environ de 90 secondes.

Sa dégradation se ferait principalement en 6-ceto PGF_{1α} (schéma 9) d'autant plus rapidement que le milieu est acide ; Cette molécule stable a une très faible activité antiagrégante, mais n'influence pas le taux d'AMPc (213).

Cette instabilité de la PGI₂ a incité à la recherche d'analogues plus stables (dérivés de la PGI₁, de la PGF_{2α}), ayant une activité comparable mais des effets secondaires limités, et susceptibles d'être utilisés en thérapeutique.

Physiopathologie

Les cellules endothéliales sont très fragiles, et comme beaucoup d'autres cellules, sensibles aux variations osmotiques, fréquentes dans le diabète du fait des modifications du métabolisme du glucose et de l'accumulation de sorbitol qui s'en suit, la plupart des tissus étant imperméables à cette substance.

La disparition du revêtement endothélial chez le diabétique, s'accompagnerait d'une baisse de la production de PGI₂ qui serait dépendante de la glycémie (53, 184, 227).

Nous citerons aussi la diminution de production de PGI₂ dans d'autres maladies, comme le purpura thrombocytopénique, expliquant peut-être la survenue de microthromboses, et son augmentation dans certains cas d'insuffisance rénale expliquant la tendance hémorragique (186).

I - 4. THEORIE DE LA BALANCE TXA₂ - PGI₂ (Moncada)

Moncada a attiré le premier l'attention sur l'importance que la PGI₂ pourrait jouer dans l'intégrité de la paroi artérielle (150).

Cet auteur a insisté sur l'action du 15-HPAA sur la PGI₂ synthétase, et sur l'éventuel effet de la peroxydation lipidique sur leur contribution à créer des états pathologiques, en diminuant la production de PGI₂ et donc la capacité des cellules endothéliales à se défendre face aux agressions.

Il a été effectivement montré par ailleurs que le taux de peroxydation lipidique est augmenté dans certaines circonstances telles que le déficit en vit E,

l'athérosclérose qui présente de hautes concentrations de peroxydes lipidiques au niveau de ses lésions (150), et dans le diabète (197). Ainsi la possibilité d'inhibition de la prostacycline synthétase par le 15-HPAA sans action sur la thromboxane synthétase, coïncidant avec des lésions vasculaires, a fait envisager par l'équipe de Vane, dont Moncada, l'existence d'une balance physiologique entre d'une part les endoperoxydes cycliques agrégants et le thromboxane A_2 plaquettaire (TXA_2) puissamment agrégant et vasoconstricteur, et d'autre part la prostacycline endothéliale (PGI_2) puissamment antiagrégante et vasodilatatrice (150), d'autant qu'il existe comme nous l'avons vu des interactions endothélio-plaquettaires.

La PGI_2 nécessite des doses inhibitrices plus élevées pour l'agrégation que pour l'adhésion avec le collagène (90), ce qui, tout en empêchant l'agrégation, permet aux plaquettes d'adhérer au vaisseau lésé (activité proagrégante du sous-endothélium vasculaire mais moindre formation de PGI_2), et de former une couche de plaquettes protectrices rétablissant la continuité vasculaire (222).

Un autre aspect de la protection vasculaire par les prostaglandines nous est donné par Dyeberg, qui a remarqué la faible incidence d'infarctus du myocarde chez les esquimaux du Groenland (155). En effet, ces sujets n'ont pas une alimentation riche en acide gras saturés athérogènes, mais consomment au contraire beaucoup d'animaux marins, riches en acide gras polysaturés, notamment en acide eicosapentaénoïque, précurseur de la série 3 des prostaglandines. Cet acide gras est présent de façon importante au niveau de leurs phospholipides membranaires, et serait à l'origine d'une orientation métabolique particulière avec synthèse de PGI_3 antiagrégante plaquettaire, et de TXA_3 sans activité biologique sur les plaquettes. Le déséquilibre ainsi créé au profit de substances antiagrégantes, pourrait expliquer la résistance de ces sujets à la thrombose, et leur temps de saignement allongé.

II - RAPPELS SUR LES COMPLICATIONS DÉGÉNÉRATIVES DU DIABÈTE

II - 1. CLASSIFICATION

Depuis la découverte de l'insuline par Best et Banting en 1922, la survie des diabétiques insulino-dépendants est devenue envisageable, et on a vu apparaître des complications superposables en grande partie à celles connues chez les diabétiques non insulino-dépendants. Les complications dégénératives ont un support vasculaire et représentent l'évolution inéluctable des deux types de diabète. Celles-ci peuvent affecter :

- Les vaisseaux de gros et moyen calibre, réalisant la macroangiopathie, au niveau surtout des membres inférieurs et des coronaires présentant alors des lésions d'athérosclérose.
- Les artérioles et capillaires, réalisant la microangiopathie, lésion spécifique du diabète touchant alors principalement l'oeil, les reins et les nerfs périphériques.

II - 1.1. LA MACROANGIOPATHIE.

Surtout caractéristique du diabète par son atteinte distale (vaisseaux musculaires et musculo-élastiques, de moyen calibre), elle est le résultat d'un remaniement de la paroi avec incorporation progressive de caillots conduisant ainsi à une diminution du lit vasculaire (19, 49) et est responsable :

- D'artériopathie des membres inférieurs.
- De coronaropathie.

Ces anomalies sortent du commun par le fait qu'elles surviennent plus tôt, sont plus fréquentes et plus graves que chez le sujet indemne de diabète, et se compliquent d'une détérioration spécifiquement microcirculatoire (136).

II - 1.2. LA MICROANGIOPATHIE.

Elle touche le système microcirculatoire composé d'artérioles, de veinules, et d'un lacis capillaire communicant (Schéma 10).

Cet ensemble, par le biais duquel les échanges métaboliques se réalisent entre la cellule et le sang, d'une cellule à une autre et enfin d'un organe à un autre, va être indubitablement, sous l'influence de nombreux facteurs, le siège de lésions compromettant dangereusement sa fonction (50). Ainsi vont être établies deux sortes de perturbations :

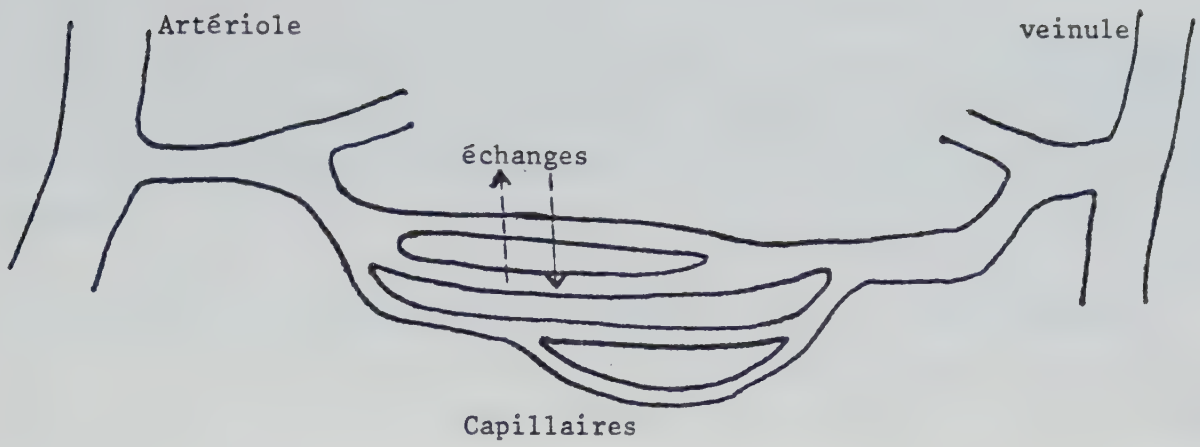


Schéma 10. SYSTEME MICROCIRCULATOIRE.

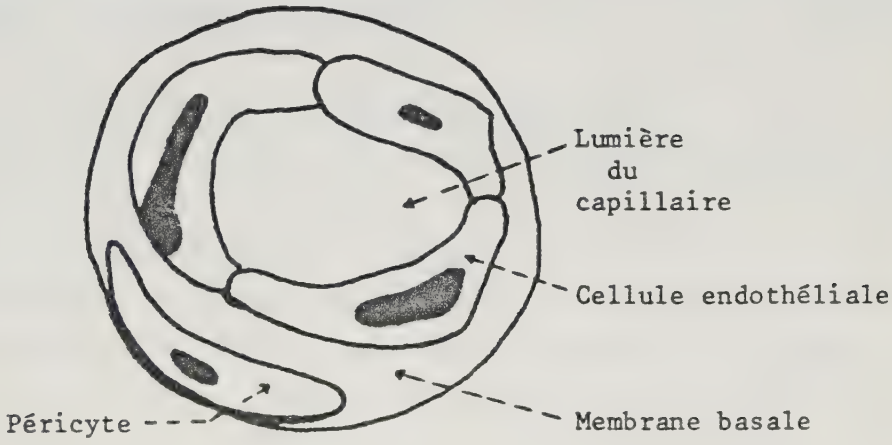


Schéma 11. COUPE D'UN CAPILLAIRE NORMAL.

- Les unes au niveau des petits vaisseaux, communes à tous les organes.

- Les autres sont la conséquence des premières au niveau d'un tissu spécialisé, et présenteront un aspect différent selon qu'il s'agit de l'oeil, du rein ou du nerf.

a - Anomalies des petits vaisseaux, (Schéma 11) (19, 49, 86) atteignant :

- La cellule endothéliale, avec anomalies métaboliques et disparition progressive des cellules après appauvrissement de leur revêtement en acides aminés glycosylés.

- La membrane basale, qui est épaissie avec son collagène exagérément polymérisé et surproduction de glycoprotéines de structure avec modification de leur arrangement.

- Le péricyte dont le métabolisme est altéré (65).

Ces perturbations vont entraîner une dilatation des veinules et une vasoconstriction des artérioles, progressives et périodiques, avec sclérose pariétale des artérioles, des veinules, et des capillaires.

Ces petits vaisseaux vont alors augmenter leur perméabilité et être le siège d'altérations du flux sanguin (113, 187).

b - Lésions spécifiques des différents tissus atteints :

§ La rétinopathie diabétique. Elle a été bien étudiée grâce à l'ophtalmoscopie, l'angiofluorographie, la microscopie électronique, et la biochimie (184).

Les anomalies passent par plusieurs stades successifs :

- Il s'établit tout d'abord une occlusion de certains capillaires qui deviennent atrophiques, avec disparition caractéristique des péricytes.

- Puis apparition dans d'autres territoires de dilatations capillaires.

- A un stade de plus, formation de microanevrismes, due aux dilatations capillaires et à la prolifération anarchique des cellules endothéliales.

- Puis, la perméabilité de ces microanévrismes va devenir anormale provoquant exsudats et hémorragies, compromettant alors la fonction visuelle.

Le stade ultime est représenté par la rétinopathie proliférante avec augmentation du nombre des cellules gliales qui synthétisent du collagène, et formation de néovaisseaux, conférant alors à la rétine une inefficacité fonctionnelle et une fragilité tissulaire pouvant être source de graves complications (hémorragies, décollement rétinien).

§ La néphropathie diabétique. Les lésions sont ici bien antérieures aux

manifestations cliniques ou biologiques, mêlant à la microangiopathie dominante, de l'artériosclérose et une atteinte du tissu interstitiel.

Seule la biopsie systématique pourrait prétendre déceler une modification précoce du tissu rénal, la plus spécifique étant la glomerulo sclérose nodulaire de Kimmelstiel-Wilson, résultat du dépôt dans le mésangium de nodules membranoïdes PAS positif (9, 210).

§ La neuropathie diabétique. Elle est la conséquence à la fois d'une démyélinisation segmentaire par détérioration de la cellule de Schwann, et d'une atteinte des vasovasorum des nerfs (129, 176, 178, 216).

II - 2. PATHOGENIE

Etant donné la diversité des métabolismes touchés dans la maladie diabétique, il est bien difficile d'en extraire un mécanisme qui serait en mesure, à lui seul, d'expliquer la survenue et l'évolution souvent rapide des complications dégénératives. Cependant, il semble bien que le système vasculaire et sanguin et plus précisément le couple endothélioplaquettaire soit directement impliqué, sinon dans le déclenchement des lésions dégénératives, du moins dans leur aggravation.

Ces différents désordres biologiques ont pour origine plusieurs hypothèses :

- Leur caractère génétique, héréditaire, pourrait expliquer leur apparition précoce.
- Leur caractère hormodépendant, lui même pouvant provenir d'une tare génétique, revêt son importance dans les observations de sujets présentant une rétinopathie améliorée, voire guérie, par hypophysectomie (Communication du Dr. J. D. Grange) (173, 174).

Nous rappellerons qu'hormis la diminution ou l'absence de sécrétion d'insuline dans le diabète insulino-dépendant, il existe une production excessive d'hormone de croissance (GH) favorisant la fragilité capillaire, et de glucagon augmentant la production des glycoprotéines avec hyperviscosité plasmatique, ainsi que le nombre des enzymes lysosomiaux cellulaires.

C'est peut-être par l'action d'un ou plusieurs des facteurs ci-dessus, ou par celle d'un agent encore inconnu, glandulaire ou non, qu'on observerait des anomalies vasculaires et sanguines.

L'aspect vasculaire ayant déjà été envisagé nous nous limiterons à en rappeler les principaux traits avant d'insister un peu plus sur l'aspect sanguin touchant de façon électorive la coagulation et principalement la fonction plaquettaire.

II. 2.1. PERTURBATIONS VASCULAIRES

- Anomalies morphologiques et métaboliques des cellules endothéliales avec parfois disparition, parfois prolifération anarchique.
- Epaississement de la membrane basale.
- Modifications morphologiques et métaboliques des pericytes.
- Dilatation veinulaire, vasoconstriction artériolaire.
- Athérosclérose, artériolosclérose.
- Diminution du lit vasculaire.

Cette paroi vasculaire ainsi restructurée , va acquérir un pouvoir thrombogène inhabituel par altération locale du flux sanguin avec phénomène tourbillonnaire. Il s'y ajoute la possibilité de communication anormale avec les éléments figurés du sang, qui sont par eux mêmes hyperactifs et peuvent rentrer en contact soit avec des plaques d'athérome, soit avec un collagène sous endothélial particulièrement thrombosant par sa faculté de haute polymérisation (collagène III) (113).

II - 2.2. PERTURBATIONS SANGUINES

Les plaquettes et les globules rouges vont avoir tendance à adhérer et à agréger au sein d'une hyperviscosité plasmatique due à l'hyperconcentration des glycoprotéines en particulier du fibrinogène (135).

Les globules rouges vont être affectés également dans leur fonction principale de transport d'oxygène par dysmétabolisme au niveau de l'hémoglobine glycosylée (5, 30, 50).

A côté de cela c'est toute l'hémostase qui semble touchée, avec une hypercoagulabilité liée à l'augmentation du taux de certains facteurs de la coagulation, ainsi qu'une hypofibrinolyse et une hyperactivité plaquettaire.

La constatation de ces différentes perturbations semble refléter une hyperactivité au sein de la coagulation que prouve un raccourcissement du temps de céphaline Kaolin, des tests de coagulabilité globale, et du temps de saignement.

a - Augmentation du taux de certains facteurs de la coagulation :

- Le fibrinogène (facteur I) dont la durée de vie serait modifiée (1, 59, 60).

- La proaccélérine, la proconvertine (facteur V et VIII).

- Le facteur Willebrand.

Le facteur VIII est une molécule complexe formée de deux sous-unités :

+ Le facteur VIII antihémophilique.

+ Le facteur VIII de Von Willebrand ; c'est celui-ci qui, synthétisé par les cellules endothéliales, semble subir une élévation de son taux malgré une diminution du revêtement endothélial chez le diabétique (11, 12, 180).

Odegaard montra en 1964, une amélioration de l'adhésivité plaquettaire des malades atteints de maladie de Willebrand, par addition de plasma de sujets diabétiques (167).

- Le facteur activant le facteur Hageman (facteur contact) du fait du remaniement endothélial, de la structure et de la composition particulière du collagène sous endothélial (127).

- L'antithrombine III : sa diminution a été affirmée par certains, (6, 62), récusée par d'autres (66).

b - Hypofibrinolyse :

La théorie de la balance hémostatique d'Astrup, a été considérée comme un mécanisme possible d'athérosclérose, par défaillance du système fibrinolytique aboutissant à la non destruction de microthrombi.

L'étude de la fibrinolyse, qui est le processus de dégradation de la fibrine par la plasmine sous l'influence de facteurs tissulaires, plasmatiques, hormonaux (adrénaline), peut être conduite grâce à différents tests dont le dosage du fibrinogène, thromboelastogramme, temps de lyse du caillot plasmatique, et d'autres tests très spécialisés.

La pratique de ces examens chez le diabétique a mené à des résultats contradictoires.

Certains auteurs trouvent une augmentation du fibrinogène (1, 76). D'autres, au contraire, trouvent une augmentation de la fibrinolyse (126).

c - Hyperactivité plaquettaire :

Cet aspect semble représenter une part importante de la pathogénie, comme l'ont montré des examens en microscopie électronique en objectivant :

- Des agrégats plaquettaires dans les veinules conjonctivales de diabétiques présentant une rétinopathie grave (51, 87).
- Des coagulations intravasculaires disséminées avec microthrombi plaquettaires diffus dans de nombreux organes lors de coma acidocétosique (117).
- Des microthrombi dans des biopsies rénales de glomérulosclérose, ou des biopsies nerveuses de **neuropathie** (169).

De nombreux auteurs ont étudié les fonctions plaquettaires, et bien que certains ne retiennent pas une hyperactivité, beaucoup d'autres ont démontré qu'elle était bien une réalité, et qu'elle touchait chaque séquence de l'hémostase primaire (31, 37, 87, 116).

Cet exposé n'a pas la prétention de décrire toutes les méthodes et résultats des multiples études effectuées sur ce sujet, mais simplement d'en retracer les grandes lignes.

§ L'adhésivité plaquettaire (37, 143) :

Elle constitue le premier temps plaquettaire de l'hémostase primaire (schéma 12).

L'hyperadhésivité plaquettaire, apparaît comme une caractéristique générale du diabète. Sa mise en évidence fait appel à plusieurs méthodes (technique de rétention aux billes de verre surtout, méthode in vivo de Borçhrevink (1961) couplée à un temps de saignement selon Ivy, etc...).

Il existe une augmentation de l'index d'adhésivité (pourcentage de plaquettes ayant adhéré, évalué par numération différentielle), de 25 à 50% dans le diabète.

Pour une technique donnée, l'index d'adhésivité se maintient aux mêmes valeurs élevées, quels que soient le sexe et l'âge du malade, le type et l'ancienneté du diabète, le niveau de la glycémie, le taux de cholestérol et des triglycérides, le traitement par l'insuline ou par un antidiabétique oral dans le cas d'un diabète non insulino-dépendant.

En revanche, il semble que l'ischémie coronarienne potentialise encore l'hyperadhésivité diabétique (143).

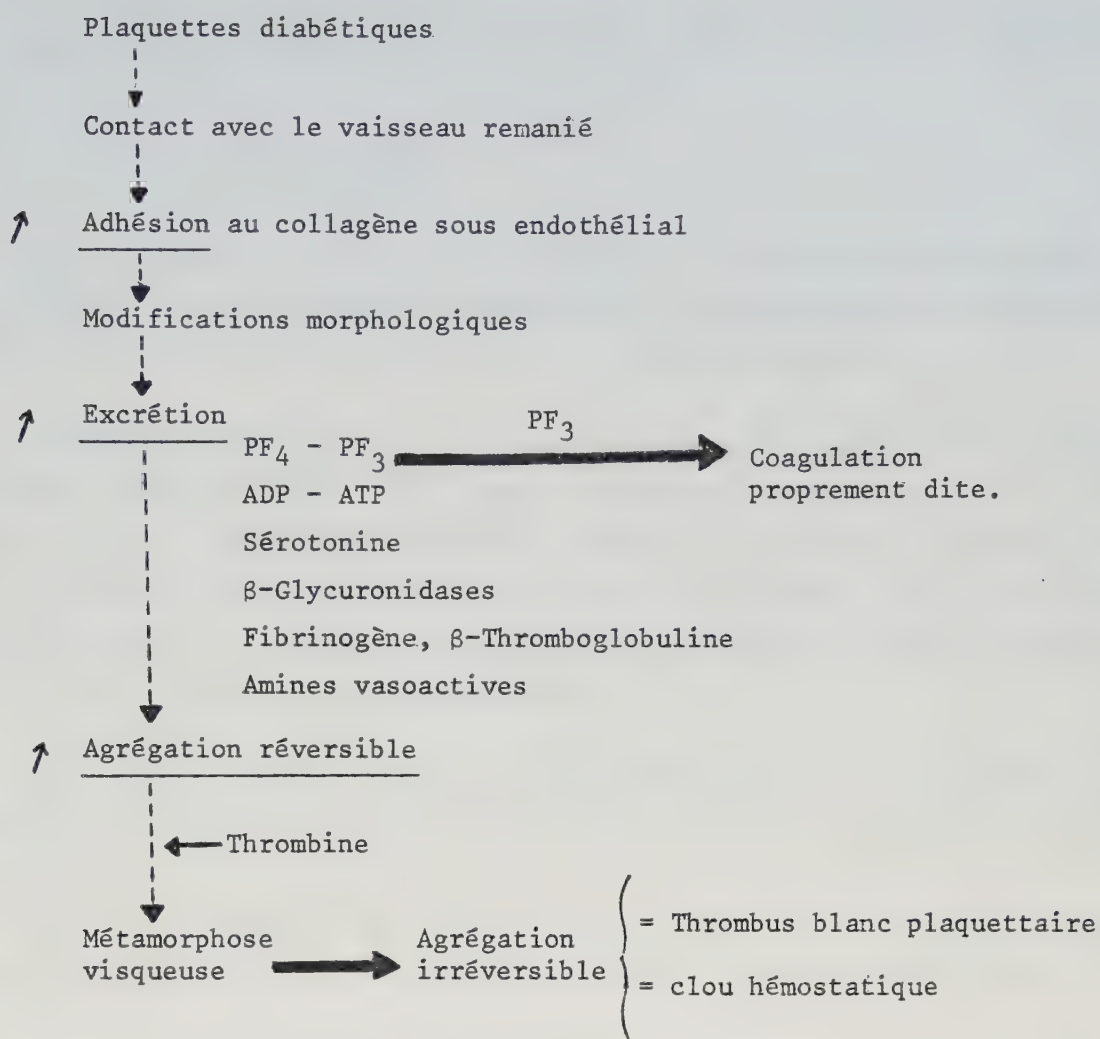


Schéma 12. PRINCIPAUX ASPECTS DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE
DANS LE DIABETE.

↑ = Augmentation.

Il y aurait en fait proportionnalité entre hyperadhésivité, et gravité de la microangiopathie ou de la macroangiopathie.

§ L'excrétion plaquettaire :

Concomitante de l'agrégation plaquettaire, l'excrétion plaquettaire (ou "release") apparaît également exagérée chez les diabétiques, comme l'objective l'augmentation des facteurs 3, 4, et de la β -thromboglobuline.

Nordoy constate que chez 10 malades présentant un diabète insulino-dépendant, anciennement diagnostiqué et compliqué de rétinopathie, néphropathie ou neuropathie, il existait une hyperactivité du facteur 3 plaquettaire phospholipidique.

L'étude biochimique des phospholipides plaquettaires, décèle une augmentation de leur taux, se faisant essentiellement aux dépens des sérine-phosphoglycérides, chez le diabétique insulino-dépendant (164).

Par ailleurs, Chmielewski et Farbiszewski démontrent une sécrétion exagérée de facteur 4, d'autant plus significative qu'il existe des complications vasculaires (32).

Preston et coll (1978), Burrous et coll (1978), constatent une augmentation du taux plasmatique de la β -thromboglobuline, chez 3 types de diabétiques (24, 178) :

- Diabétiques avec complications graves.
- Diabétiques sans complications.
- Diabétiques de découverte récente avant traitement.

Dans tous les cas le taux de β -thromboglobuline est significativement plus élevé que chez le sujet normal, et d'autant plus qu'il existe des complications vasculaires.

Nous noterons que Campbell et coll à Edimburg en 1977, n'ont pas retrouvé cette augmentation, fait probablement dû à une technique et à des réactifs différents (29).

§ L'agrégation plaquettaire : (35, 36, 37, 77, 87, 116, 190).

Depuis la mise au point en 1962 par Born, d'une méthode turbinométrique de mesure de l'agrégation plaquettaire par analyse photométrique, l'agrégation plaquettaire a été le paramètre de l'hémostase le plus étudié (18).

On utilise un inducteur de l'agrégation tel que l'ADP, l'adrénaline, le collagène, l'acide arachidonique, qui, ajouté à un plasma riche en plaquettes (PRP), provoque la formation d'agrégats plaquettaires avec chute de la densité optique.

Ce test, le plus communément utilisé, conclut, ainsi que la mesure de pression de filtration (technique de Swack) et la mesure des microagrégats circulants (méthode de Wu et Hoak), à une hyperagrégabilité plaquettaire du diabète quel que soit son stade.

La méthode photométrique.

L'agrégation peut s'exprimer par trois critères : la vitesse d'agrégation, l'agrégation maxima ou index d'agrégation, et la vitesse de désagrégation.

Heath observe un raccourcissement du temps d'agrégation chez les diabétiques porteurs de rétinopathie grave (87).

Heath et Kwaan remarquent un accroissement significatif de l'index d'agrégation de l'ordre de 27%. Hormis l'ancienneté du diabète, les auteurs n'ont pas noté d'influence de la glycémie, de l'insuline, du taux des lipides totaux, du cholestérol, des triglycérides ou des acides gras libres.

Les complications vasculaires majorent, là aussi, l'hyperagrégabilité plaquettaire (87, 116).

Selon Heath et Regnault, les diabétiques porteurs de rétinopathie diabétique présentent une vitesse de désagrégation diminuée, qui devient presque nulle en cas de lésions sévères (87, 182). La réduction de la désagrégation est retenue par la majorité des auteurs, ainsi que l'hyperréactivité à de faibles doses d'ADP (87, 169, 173, 183).

Prost-Dvojakovic et coll n'ont pas constaté d'anomalies de la vélocité ni de la chute de densité optique avec des diabètes compliqués ou non (180).

Passa ne retrouve une augmentation de la chute de densité optique que chez des diabétiques présentant des complications, mais pas en l'absence de rétinopathie, ni après hypophysectomie (173, 174).

La plupart de ces manipulations ont été faites avec l'ADP comme inducteur, mais également avec l'épinéphrine et le collagène.

Mesure de l'agrégation par pression de filtration.

Grâce à un filtragrégomètre, selon la méthode de Hornstra, Fleishman

a montré les agrégats plaquettaires et a ainsi confirmé le raccourcissement significatif du temps d'agrégation, mais également un défaut de désagrégation (61).

Autres méthodes

- Mesure de microagrégats circulants (238).

Le nombre de microagrégats est plus élevé chez le diabétique, d'autant plus qu'il existe des complications.

- Recherche de la dose minimale agrégante en présence de concentrations variables d'inducteur (190).

- Agrégation spontanée.

L'hyperagrégabilité de certains diabétiques présentant des complications est parfois telle, qu'une auto agrégation spontanée peut se produire par simple agitation magnétique du PRP sans apport d'inducteur.

§ Autres signes d'hyperactivité plaquettaire :

- Diminution de la demi-vie plaquettaire.

Elle est de trois jours au lieu de quatre lorsqu'elle est appréciée grâce à un marquage au chrome 51 chez des diabétiques présentant des complications (2). Fergusson trouve un raccourcissement significatif de la demi-vie plaquettaire par un marquage à la selenométhionine 75 (5,2 jours $\pm$ 2,3 chez le diabétique) (11,7 jours $\pm$ 5,4 chez le sujet normal), chez des sujets indemnes de complications vasculaires (60). Cette diminution reflète une utilisation plaquettaire accrue par thrombose disséminée latente du diabète (117).

- Elévation du pourcentage des mégathrombocytes ou plaquettes jeunes hyperactives.

Pour Garg (1972), il s'agit d'une accélération de leur turn over avec production médullaire majorée secondaire à la consommation périphérique (67).

- Activités coagulantes des plaquettes.

Il est actuellement admis depuis les travaux de P. Walsh, que les plaquettes peuvent directement catalyser les réactions des facteurs de la coagulation intrinsèque (231).

S. Levy-Toledano et coll (1978), ont dosé 3 activités coagulantes des plaquettes, chez des diabétiques avec ou sans complications (128).

Le CPFA (contact product forming activity) : Après stimulation par l'ADP, les plaquettes peuvent déclencher la coagulation intrinsèque par activation du facteur XII ou facteur contact.

Le CICA (collagen induced coagulant activity) : Après stimulation par le collagène, les plaquettes peuvent induire la coagulation intrinsèque par activation du facteur XI, en l'absence du facteur XII.

Le PF_3A (platelet factor 3 activity) : Ce facteur 3 phospholipidique peut entraîner la coagulation intrinsèque en activant le facteur X.

Ces trois activités coagulantes plaquettaires sont augmentées dans le diabète présentant des complications vasculaires ; seul le PF_3A est augmenté en l'absence de complications.

- Anomalies biochimiques plaquettaires.

Les perturbations dynamiques des plaquettes sont le mode d'expression des déviations du métabolisme interne des cellules. Des travaux biochimiques récents tentent d'élucider les mécanismes intracellulaires métaboliques et énergétiques qui font du diabète une véritable thrombopathie. On distingue :

+ Des anomalies du métabolisme glucidique plaquettaire (225).

. Augmentation du glycogène, polysaccharide représentant la réserve d'énergie de la plaquette. La stimulation de son anabolisme pourrait être la conséquence d'une captation excessive de glucose.

. Augmentation de la glycolyse anaérobie.

Il s'agit d'une véritable déviation du métabolisme avec activation préférentielle de certaines enzymes et accumulation d'intermédiaires (fructose 1-6- diphosphate, acide phospho 2 et 3 glycérique) et de l'acide pyruvique, et diminution par ailleurs de fructose-6-phosphate.

+ Des anomalies de la biosynthèse des prostaglandines plaquettaires (77).

- Hyperagrégabilité des diabétiques à l'acide arachidonique, précurseur des prostaglandines plaquettaires (190).

- Augmentation des produits "Prostaglandin E-like" (IPGE) mesurés par radio-immunologie, et de leur cinétique de production (77).

- Un régime riche en acide arachidonique augmente l'hyperagrégabilité à l'ADP et à l'adrénaline (201).

L'agrégation plaquettaire, s'exprimant par les endoperoxydes de prostaglandines et surtout le thromboxane A_2 (TXA_2) de découverte récente, on peut en déduire que toute la chaîne de synthèse des prostaglandines, principalement celle donnant naissance au TXA_2 , est affectée, avec augmentation de la cinétique des réactions et du taux des différents produits formés.

§ Autres fonctions défavorables des plaquettes : (161)

- L'excrétion par la plaquette de facteurs de perméabilité endothéliale qui diminuent la résistance vasculaire.

- La libération après contact avec la paroi vasculaire, d'un facteur mitogène, stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses.

Ces viciations des fonctions plaquettaires peuvent admettre pour origine un facteur plasmatique ou un facteur plaquettaire propre, peuvent être initiales, faisant partie intégrante de la maladie diabétique, ou secondaire et dues aux troubles de la glycorégulation, peuvent être la source des complications ou en être la conséquence.

Kwaan et coll, en utilisant des plaquettes isolées et du plasma pauvre en plaquettes suggèrent que le trouble est d'origine plasmatique (116) alors que Bensoussan et coll, utilisant des plaquettes filtrées sur gel, admettent une origine plaquettaire (11).

III - POSITION DU SUJET.

L'étude de l'hémostase dans le diabète, tire son intérêt de la fréquence des thromboses, résultat d'un déséquilibre entre le contenant (paroi vasculaire) et le contenu (sang).

Notre travail a consisté à tenter de préciser les anomalies plaquettaires des diabétiques insulino-dépendants et à en expliquer les mécanismes en utilisant les découvertes récentes à propos des prostaglandines.

B A S E S D E T R A V A I L .

I - INTRODUCTION AU TRAVAIL.

Nous avons vu l'importance des prostaglandines et du TXA_2 dans l'agrégation et l'excrétion plaquettaire, ce qui n'implique pas définitivement leur rôle dans la pathogénie des thromboses. La connaissance d'une hyperagrégabilité plaquettaire chez le diabétique avec augmentation de la synthèse du matériel "Prostaglandin E-like" (77), ainsi que des anomalies vasculaires, nous a conduit à examiner les interactions plaquettes-plasma-paroi vasculaire, afin d'essayer de cerner davantage le rôle des prostaglandines et produits apparentés, dans la véritable thrombovasculopathie que constitue le diabète.

Cet exposé ne rapporte ici que certains aspects biologiques du travail, effectué par ailleurs au laboratoire, qui comprend :

- L'étude de la disponibilité de l'acide arachidonique pour la prostaglandine synthétase et la lipoxygénase, par détermination de la dose minimale agrégante à l'arachidonate de sodium, par dosage du malondialdéhyde (MDA), par captation de l'acide arachidonique par les protéines plasmatiques, par le dosage colorimétrique des acides gras non estérifiés du plasma, et enfin par la mesure des catabolites de l'acide arachidonique endogène.

- L'étude de l'activité prostaglandine synthétase et lipoxygénase plaquettaire, en présence d'acide arachidonique exogène, par dosage radiochimique de ses produits de transformation (TXB_2 , HHT, HETE, PGE_2 , $\text{PGE}_2\alpha$).

- La durée de vie plasmatique du TXA_2 , transformé en mono-O-méthyl- TXB_2 lequel est dosé par une technique radiochimique.

- Le dosage des acides gras hydroperoxylés, inhibiteurs de l'activité prostacycline synthétase endothéliale, par méthode enzymatique, ainsi que le dosage colorimétrique de la vitamine E, antioxydant et s'opposant à la formation des acides hydroperoxylés.

- La recherche d'une agrégation spontanée.

Un compte rendu rapide des résultats de ces techniques, sera donné à la fin du chapitre qui leur est concerné.

La part du travail nous intéressant directement ici, avait pour but d'apprécier la disponibilité de la PGH_2 (endoperoxyde) pour la prostacycline synthétase endothéliale. Nous avons pour cela induit des agrégations plaquettaires en présence ou en l'absence de "microsomes endothéliaux" standardisés en ajoutant du collagène à un plasma riche en plaquettes ou à des plaquettes isolées. Les

réponses obtenues ont été comparées à celles données en présence de prostacycline (PGI_2) de synthèse.

Une étude parallèle de la sensibilité des plaquettes a été effectuée par la recherche de la dose minimale agrégante à l'arachidonate de sodium et au collagène.

Il sera également fait état de quelques actions pas encore très précises de l'insuline sur l'activité plaquettaire.

De nouvelles orientations ont modifié le protocole entre temps, rajoutant à l'étude sur plasma riche en plaquettes, celle sur plaquettes isolées, et à l'étude de la réponse de la PGI_2 sur l'agrégation plaquettaire, celle de la PGE_1 et de la PGD_2 . Pour cette raison, et parfois pour des raisons techniques, tous les résultats ne se rapporteront pas à l'ensemble des 30 couples témoin-malade qui ont été testés ; Le cas échéant, une case vide figurera à l'emplacement prévu pour les valeurs trouvées sur les tableaux récapitulatifs, lors de l'exposé des résultats.

Dans ce chapitre, il sera établi tout d'abord une description du mode de sélection des témoins et des malades, puis seront précisés les matériels et méthodes ayant servi à la réalisation et à l'interprétation de ce travail.

Dans d'autres chapitres, on envisagera les résultats et leur analyse.

II - SELECTION DES MALADES ET DES TEMOINS.

II - 1. SELECTION DES MALADES.

La plupart des malades ont été adressés au laboratoire pour étude relative au protocole des prostaglandines, par le Service d'Endocrinologie et des maladies Métaboliques du Professeur MORNEX R. à l'hôpital de l'Antiquaille, et par le Docteur GRANGE J.D. Ophtalmologiste à l'hôpital de la Croix Rousse dans le Service du Professeur BONNET.

La susceptibilité des plaquettes aux facteurs environnants, notamment médicamenteux, justifie une sélection rigoureuse des sujets pour l'appréciation des tests concernant leurs fonctions plaquettaires.

Les critères suivants ont été retenus en collaboration avec le personnel médical de l'hôpital de l'Antiquaille (Pr. MORNEX R., Pr. BERTHEZENE F. et assistants) et le Dr. GRANGE J.D.

- Malade présentant un diabète insulino-dépendant, récent ou ancien, compliqué ou non, mais ne présentant pas de signes cliniques de gravité relatifs aux complications (rétinopathie grave, insuffisance rénale, infarctus du myocarde, infection en cours, ou signes fonctionnels de polyneuropathie évolutive) ni de pathologie associée au diabète (hyperthyroïdie, sclérose en plaques, hypertension...).

- Malade ayant eu un bilan clinique et paraclinique détaillé dans un service spécialisé possédant un dossier clinique concernant l'intéressé.

- Absence de prise médicamenteuse autre que le traitement substitutif par l'insuline, dans les huit jours au moins précédant les tests (aspirine, antibiotiques, oestroprogestatifs ...). Un interrogatoire particulièrement précis et orienté sur ce sujet avait lieu, avant chaque prise de sang.

- Tabagisme modéré (moins de 10 cigarettes par jour) ceci pour éviter l'association de deux entités pathologiques à tropisme vasculaire et pour minimiser l'effet éventuel, d'ailleurs discuté, du tabagisme sur l'activation plaquettaire, rendant ainsi plus spécifiques du diabète, les anomalies fonctionnelles des plaquettes.

- Limitation des graisses du petit-déjeuner pour éviter l'activation plaquettaire qui pourrait être secondaire à une synthèse exagérée de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique fourni en excès à la plaquette.

II - 2. SELECTION DES TEMOINS.

Le choix des témoins s'est réalisé dans le plus grand souci du respect de

l'homogénéité des couples (malade-témoin), en tenant compte :

- De l'âge, d'autant plus qu'il semble exister une hyperactivation plaquettaire proportionnelle à celui-ci. Donc les témoins et les malades se trouveront dans une même catégorie d'âge, et les variations ne dépasseront pas, en général, cinq ans.

- Du sexe. De nombreuses fluctuations physiologiques connues par ailleurs entre le sexe masculin et le sexe féminin, et pouvant avoir lieu au niveau de l'activité plaquettaire, nous avons tenu à ce que pour chaque malade, corresponde un témoin de même sexe.

- De la santé du témoin, qui doit être irréprochable au moment des tests ; On s'était assuré, là aussi, par un interrogatoire rigoureux de l'absence de prise médicamenteuse dans les huit jours au moins ayant précédé la prise de sang.

- Des mêmes conditions concernant le tabagisme.

Pour les témoins, on avait conseillé, de façon peut-être moins absolue que pour le malade, un petit-déjeuner pauvre en graisses.

Cependant, des exceptions à ces règles fondamentales ont parfois été admises chez le malade ou le témoin, et seront signalées sur les tableaux d'observations (prise d'oestrogestatif, hyperlipidémie, tabagisme).

Devant les difficultés de recrutement, bien que des efforts aient été faits pour diversifier au maximum les témoins, il a parfois été nécessaire de faire appel, à plusieurs reprises, à la même personne.

III - MATERIELS ET METHODES.

III - 1. CIRCONSTANCES DU PRELEVEMENT.

Les différents tests du protocole ont été réalisés chaque fois par comparaison malade-témoin.

Des rendez-vous fixaient au malade la date et l'heure du prélèvement. En général, celui-ci avait lieu un mardi ou un jeudi, le matin à 11 heures, et consistait en la prise de 80 ml de sang veineux. Le témoin, de même sexe et approximativement de même âge, était ponctionné à la suite du malade, par la même infirmière, puis rapidement et simultanément les tubes de sang du malade et du témoin étaient soumis à une centrifugation à 100 g.

Les manipulations avaient lieu trois heures et demie à quatre heures après le prélèvement, pour des raisons de disponibilité de matériel. Mais, il est apparu, comme nous le détaillerons plus loin, que les résultats concernant la PGI_2 et l'insuline n'en étaient que plus stables.

III - 2. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

L'action des prostaglandines inhibitrices a été appréciée sur plasma riche en plaquettes et sur plaquettes isolées.

a - Préparation du plasma riche en plaquettes (PRP) et du plasma pauvre en plaquettes (PPP).

Elle a été effectuée à partir de sang prélevé sur tube plastique citraté de 13 mm de diamètre interne, contenant 1 ml de citrate trisodique à 3,8% aux propriétés anticoagulantes, pour 9 ml de sang (28). Celui-ci a ensuite été centrifugé à 100 g pendant 15 minutes à 20°C. Le surnageant constitue alors un plasma riche en plaquettes, citraté (PRPc). Une numération plaquettaire sur cellule de Thoma, aura alors pour but d'évaluer approximativement le nombre de plaquettes chez le témoin et le malade, et de procéder par dilution avec du plasma pauvre en plaquettes, citraté (PPPc), à une équilibration des chiffres. Celui-ci est obtenu à partir du culot récupéré après extraction du PRPc, par une nouvelle centrifugation à 1250 g pendant 10 minutes à 20°C.

b - Préparation des plaquettes isolées. (120)

Les plaquettes isolées sont des plaquettes retirées du milieu plasmatique

par centrifugation, et remis en solution dans un milieu tampon.

De nombreuses méthodes de préparation ont été décrites, utilisant dans les milieux de "lavage" différentes substances, dont l'albumine, protecteur physique et inhibiteur de l'agrégation spontanée des plaquettes à pH = 7,35 (123, 160).

Toutes ces méthodes altèrent plus ou moins l'ultrastructure des plaquettes (240), celle de Mustard est la moins traumatisante, et était la plus employée au laboratoire où une nouvelle technique simple et efficace a été mise au point (120), n'utilisant pas l'albumine, qui est capable de piéger une grande quantité d'acides gras dont l'acide arachidonique (206, 209).

Elle consiste à prélever du sang dans un tube de verre siliconé contenant un anticoagulant type ACD (acide citrique 0,8%, citrate trisodique 2,2%, dextrose 2,45%) à pH 4,5, à raison d'un volume d'anticoagulant pour neuf volumes de sang. Toutes les manipulations sont effectuées à température ambiante (20°C). Le sang est centrifugé à 100 g pendant 15 minutes. Le PRP surnageant est alors prélevé et son pH est ajusté à 6,4 par l'acide citrique 0,15 M. Le PRP est ensuite fractionné dans des tubes coniques siliconés de 6 ml, et centrifugé à 900 g pendant 10 minutes.

Ensuite, le surnageant de chaque tube, formé de plasma pauvre en plaquettes, est retiré avec précaution. L'acidification préalable aura évité l'agrégation spontanée des plaquettes entre elles lors de l'obtention du culot, qui est alors remis en suspension dans 6 ml d'une solution de "Tyrode-Hepes" à pH 7,35, contenant :

NaCl : 0,137 M ; KCl : 2,68 mM ; NaHCO_3 : 11,9 mM ; NaH_2PO_4 : 0,416 mM ;
 MgCl_2 : 1 mM ; Glucose : 0,555 mM ; Hepes : 5 mM.

La suspension est conservée à la température ambiante (18-20°C), et les plaquettes restent ainsi fonctionnelles une journée entière.

Le contrôle ultrastructural réalisé par le Professeur BRYON (Pav. E. Bis à l'Hôpital Edouard Herriot) n'a pas montré d'altération.

La contamination protéique est faible (0,7% pour l'albumine, et 0,6% pour le fibrinogène) ; elle a été évaluée après incubation du PRP pendant 30 minutes en présence d'albumine humaine ou de fibrinogène tous deux marqués à l'iode 125 et après centrifugation, par mesure de la radioactivité sur plasma pauvre en plaquettes et sur la suspension de plaquettes isolées.

Les doses d'inducteur, nécessaires pour provoquer l'agrégation, sont plus faibles que celles utilisées avec d'autres méthodes (160), du fait de l'absence d'albumine, présente normalement à une concentration de 3,5 g/l (Méthode de Mustard).

c - Préparation des microsomes de cellules endothéliales.

Nous avons utilisé une technique dérivée de celle de Moncada et coll (1976), qui ont montré que l'activité microsomique pouvait effectuer la synthèse d'une substance instable : la PGX (149), ou PGI_2 , puissamment inhibitrice de l'agrégation plaquettaire. Pour cela, ils ont préparé des microsomes à partir d'aortes de lapins et de porcs qu'ils ont congelées dans l'azote liquide après les avoir débarassées de leur adventice, puis réduites en poudre. Celle-ci a été mise en suspension, homogénéisée à grande vitesse, puis l'homogénéisat a subi une centrifugation différentielle (1000 g pendant 15 min., 10. 000 g pendant 5 min., et 100.000 g pendant 60 min.). Le culot final a été remis en suspension et lyophilisé. L'activité antiagrégante a pu être testée sur PRP ou sur plaquettes isolées ; Celle-ci pourrait être due à un effet non spécifique des phospholipides, composant normal des fractions microsomiques, dont la phosphatidyl sérine connue pour avoir un effet antiagrégant (150) ; Mais celui-ci est extractible par l'ether, et ne correspond pas, par ailleurs, aux critères de sélectivité de l'activité prostacycline synthétase, à savoir :

- Son inhibition par l'acide 15-hydroperoxyarachidonique (15 HPAA)
- Sa disparition après ébullition pendant 30 sec, et son instabilité à température ambiante (disparition de l'activité en quelques heures).

Nous avons cependant été conduits à la recherche d'une nouvelle méthode, qui ne présentait pas les inconvénients de celle décrite ci-dessus, tels sa faible rentabilité (quantité d'aorte nécessaire par rapport à l'activité inhibitrice potentielle et effective obtenue) ou l'activité proagrégante accompagnant fréquemment la préparation, probablement due à une contamination par du collagène ou par d'autres structures vasculaires (150). Pour contrecarrer ce dernier inconvénient, un temps d'incubation long (PRP + Microsomes) d'au moins 4 ou 5 minutes est nécessaire avant l'adjonction de l'inducteur, permettant alors à l'activité inhibitrice due à la synthèse de la PGI_2 de dépasser le phénomène d'agrégation lié au collagène ou autres substances.

Pour disposer d'un stock de "microsomes" ou plus exactement d'une activité antiagrégante microsomique fiable et à peu près comparable d'un test à l'autre, nous avons procédé comme suit :

Nous avons choisi comme matériel biologique pour notre préparation, des cordons ombilicaux fournis par la maternité de l'hôpital Edouard Herriot. Ces cordons, récupérés dans du sérum physiologique à 0,9% ou autre liquide physiologique, doivent être gardés à basse température (réfrigérateur) jusqu'au moment de la manipulation

qui doit avoir lieu, pour une bonne rentabilité, dans les 18 heures suivant le prélèvement et en chambre froide. Ces cordons sont alors rincés avec le même liquide physiologique.

Après avoir repéré la veine ombilicale, une tige-guide est introduite dans sa lumière de façon à pouvoir découper le cordon le long du trajet de la veine et parvenir ainsi à la mise en évidence de la surface endothéliale. Un rinçage encore abondant a lieu de façon à éliminer tous les éléments figurés du sang et la contamination plasmatique. Puis, à l'aide d'un scalpel, la surface propre et lisse, est séparée du reste du cordon. On peut ainsi détacher en lambeaux la partie la plus interne et la plus fine possible de la veine. Ces fragments sont ensuite mis dans l'eau distillée (environ 3 ml pour 10 cm de cordon), où un choc osmotique provoque une lyse cellulaire, complétée par une congélation-décongélation, puis sont retirés du liquide, lequel est filtré à deux reprises sur filtre Millipore de 0,22 μm . Quelques microlitres du filtrat ainsi obtenu, possèdent une très importante activité antiagrégante plaquettaire. Il est alors réparti dans des tubes eppendorf, au moyen de microseringues, et mis à lyophiliser à -30°C . La conservation est ensuite effectuée à moins 60°C .

Avant chaque manipulation, le lyophilisat d'un tube était remis en suspension dans une solution de "Plain Tyrode" (*dilution à 5% d'une solution d'un litre d'eau distillée contenant : NaCl : 160 g/l ; KCl = 4/l ; NaHCO_3 = 20 g/l ; NaH_2PO_4 = 1 g/l ; pH = 7,35*), dans un volume environ égal au quart de celui qui a été lyophilisé, ceci trois mois après la préparation du stock. Il semble, effectivement, exister une perte d'activité importante due à la lyophilisation (activité deux fois moindre à volume égal), qui diminue encore de moitié dans les deux-trois mois suivants. L'activité semble alors à peu près stable pendant de nombreux mois (recul de 36 mois). On peut procéder de la même manière à partir d'aortes animales.

Désormais nous utiliserons par abus, le terme de microsomes, pour citer la préparation obtenue, qui répond effectivement aux critères de sélectivité de la prostacycline synthétase, dont on a montré son appartenance à la fraction microsomique (149) :

- Son activité antiagrégante disparaît après ébullition pendant 30 secondes, et elle est inhibée par l'incubation préalable de microsomes, soit avec l'acide 15-hydroperoxy-5, 8, 11, 13 eicosatetraénoïque (5 à 10 $\mu\text{g/ml}$) (= 15 HPAA actuellement dénommé 15 HPETE) pendant 5 minutes à 37°C (schéma 13), soit avec la tranylcipromine (400-500 $\mu\text{g/ml}$) pendant 2 minutes à 37°C . (schéma 13).

Si la tranylcipromine ne possède pas d'action sur l'activité plaquettaire, du moins à de telles concentrations, il semble que le 15-HPETE puisse l'influencer

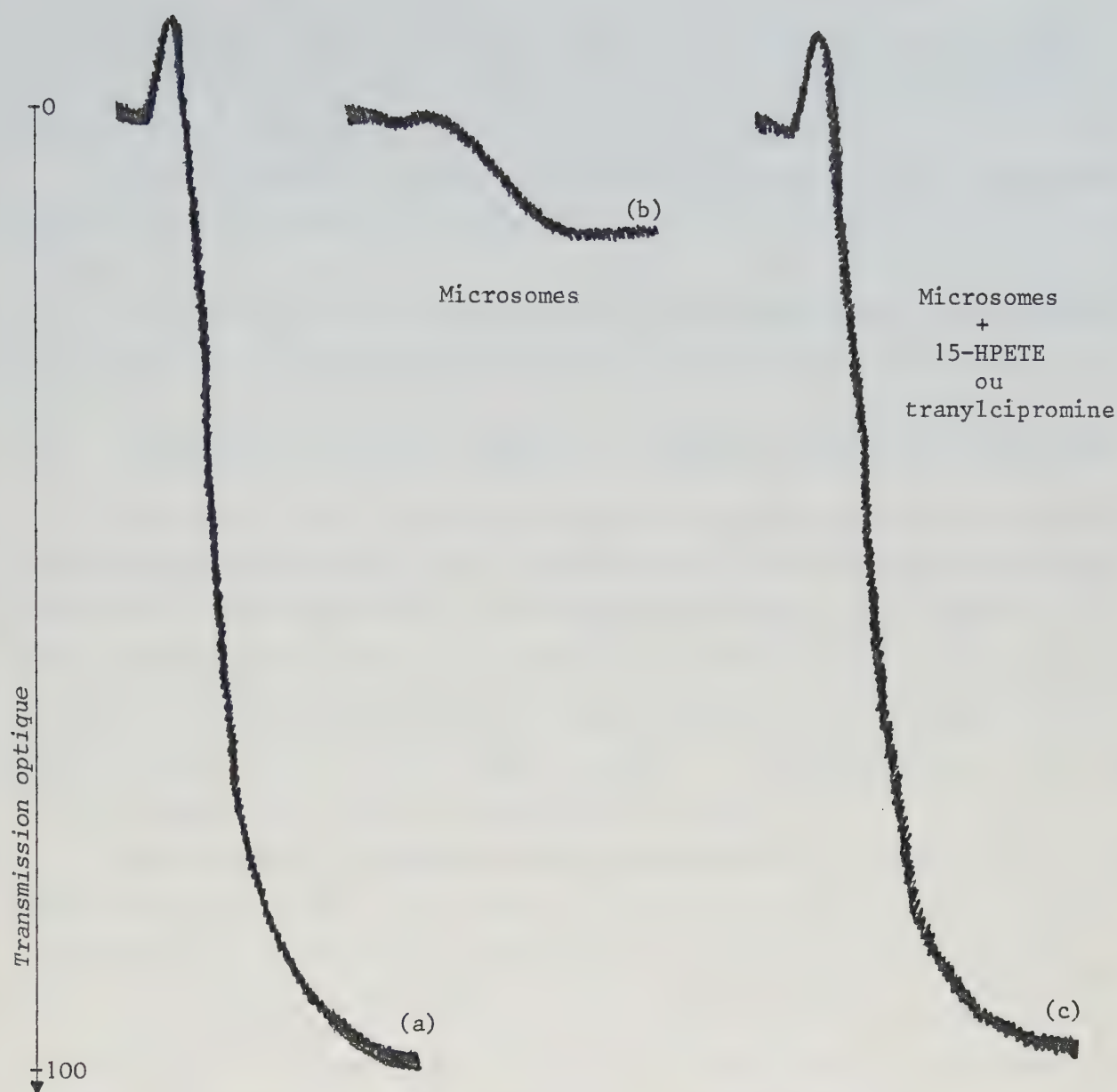


Schéma 13. AGREGATIONS DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES. INDUCTION A L'ARACHIDONATE DE SODIUM (0,5 à 1,2 mM).

EFFET DES MICROSOMES, ET INHIBITION DE LEUR ACTIVITE PAR LE 15-HPETE OU LA TRANYLICIPROMINE.

- (a) : PRPc + Arachidonate de sodium.
- (b) : PRPc + microsomes + Arachidonate de sodium.
- (c) : PRPc + $\left[\begin{array}{c} \text{microsomes} + \\ \text{15-HPETE} \\ \text{ou} \\ \text{tranylcipromine} \end{array} \right] + \text{Arachidonate de sodium.}$

dans le sens d'une inhibition, ce qui nécessite son adaptation dans un champ étroit de concentrations, avec comme inducteur de l'arachidonate de sodium à 1,2 mM alors que 0,5 mM peuvent suffire pour la tranylcipromine.

- Son activité est instable et disparaît en quelques heures à température ambiante (en 24 à 48 heures au réfrigérateur).

Nous avons ainsi pu obtenir un matériel biologique à peu près standardisé, pour l'étude de l'activité prostacycline synthétase chez les diabétiques.

III - 3. DESCRIPTION TECHNIQUE DU MATERIEL D'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE.

Les tests in vitro d'activité plaquettaire sur PRP ou plaquettes isolées de diabétique ou de témoin, ont été effectués par l'intermédiaire d'un agrégomètre type Icare à double piste, avec enregistreur unique, type Bryans. Cet ensemble permet une appréciation de l'agrégation plaquettaire (méthode de Born), par enregistrement, sur papier gradué grâce à un stylet encre, de la transmission lumineuse à travers une cuve contenant le PRP ou les plaquettes isolées, avec différents réactifs. L'action d'un champ magnétique sur un barreau aimanté placé dans la cuve, permet une agitation à environ 1100 tours/min.

Une agrégation plaquettaire, sous la dépendance de l'agitation et d'un inducteur, entraîne au sein de la cuve une chute progressive de la densité optique, avec augmentation de la lumière transmise, le stylet se déplaçant alors de 0 à 100, le "0" étant réglé par le PRP ou les plaquettes isolées, le 100 par le PPP ou la solution de suspension des plaquettes (Tyrode-Hepes). La température de la cuve est réglée et maintenue à 37°C. Ce type d'appareil permet de déclencher deux agrégations à quelques secondes d'intervalle, réunissant de cette façon les mêmes conditions pour le malade et le témoin.

Nous avons également utilisé d'autres matériels de précision, tels que les pipettes réglables ou les seringues "Hamilton" de 5 et 10 µl.

III - 4. REACTIFS UTILISES.

Grâce au type de matériel décrit ci-dessus, nous avons testé sur 400 µl de PRP ou de plaquettes isolées les effets :

a - D'inducteurs (Collagène, Arachidonate de Sodium).

Le collagène "Horm" (Munich) a été choisi pour son mode d'action faisant

intervenir de façon prépondérante la biosynthèse des prostaglandines plaquettaires; La concentration utilisée, en présence des inhibiteurs, est fixe et de 2,5 µg/ml.

La concentration minimale d'inducteur capable d'entraîner au moins 50% d'agrégation après préchauffage à 37°C pendant environ une minute (dose minimale agrégante), a été recherchée pour le collagène à des concentrations variables exprimées en microgramme par millilitre, et pour l'arachidonate de sodium; Celui-ci, fourni par Sigma (St-Louis), a été utilisé à des concentrations variables, exprimées en millimolaire en PRP, et en micromolaire en plaquettes isolées.

b - D'inhibiteurs (PGI_2 , Microsomes, PGD_2 , PGE_1).

- La prostacycline (PGI_2). Elle a été synthétisée et aimablement fournie par la compagnie Upjohn (Kalamazoo, Dr. J.E. Pike), sous forme de poudre. Pour disposer d'un réactif à peu près standardisé, il est nécessaire de solubiliser la poudre dans l'éthanol à 95% stabilisé par Na_2CO_3 (0,0133 mg/ml), afin d'obtenir une solution mère de PGI_2 de 1 mg/ml, la plus stable possible. Avant chaque emploi, une dilution d'un million de fois dans l'éthanol à 95% stabilisé est nécessaire, de façon à utiliser une concentration d'environ 1 µg/ml.

La PGI_2 était incubée pendant une minute dans le PRPc ou les plaquettes isolées, du malade ou du témoin à une concentration variant de 0,5 à 2 ng/ml selon le cas mais toujours identique chez le malade et le témoin du même jour.

L'agrégation plaquettaire était ensuite déclenchée par le collagène.

Pour obtenir des effets reproductibles de la PGI_2 sur l'agrégation plaquettaire, il semble nécessaire d'utiliser du PRP préparé plusieurs heures auparavant. Effectivement, sur du PRP frais obtenu depuis moins de 3-4 heures, l'inhibition ne se maintient pas à une valeur identique au cours d'agréga-tions pratiquées avec les mêmes concentrations d'inducteur et d'inhibiteur. Après ce délai, la réponse devient stable; aussi avons nous testé l'action de la PGI_2 sur les plaquettes des diabétiques et des témoins 3 heures et demie à 4 heures après le prélèvement de sang.

- Les microsomes. Ils ont également été incubés pendant une minute dans le PRPc ou les plaquettes isolées. La quantité employée était en rapport avec l'activité de la préparation (environ 15 µl), mais toujours identique chez le malade et chez le témoin.

- Les autres prostaglandines inhibitrices (PGD_2 , PGE_1) ont été fournies par la même compagnie, sous forme de poudre.

La PGD_2 et la PGE_1 sont des prostaglandines stables. Les concentrations utilisées se situent aux alentours de 12-15 ng/ml pour la PGE_1 et de 6-8 ng/ml

pour la PGD_2 . Les solutions mères étant là aussi à une concentration de 1 mg/ml dans l'éthanol, une dilution est effectuée avant chaque manipulation. Chaque fois, une concentration égale est utilisée chez le malade et chez le témoin ; l'incubation est, là aussi, d'une minute.

c - L'insuline

Nous avons testé l'insuline "Rapitard" à une concentration de 80 $\mu\text{U/ml}$, sur du PRP de sujets normaux, préparé depuis moins de 4 heures. Après une incubation de 5 minutes à 37°C , l'agrégation fut induite par le collagène à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Nous avons observé le comportement de l'insuline sur du PRP frais, en présence de 1 ng/ml de PGI_2 .

L'étude de l'action d'un inhibiteur ou de l'insuline en présence d'un inducteur (collagène), sera toujours faite par rapport à une courbe contrôle utilisant le milieu de suspension du réactif : l'éthanol pur (pour PGD_2 , PGE_1), ou à 95% stabilisé par Na_2CO_3 (pour PGI_2) ; Une solution de "Plain Tyrode" pour les microsomes et l'insuline. La quantité d'éthanol apportée ne dépassera jamais 1/200^è du volume de PRP ou de plaquettes isolées ; Celle de "Plain Tyrode", sera inférieure au 1/10^è (soit inférieure à 40 μl).

III - 5. DEFINITIONS DE LA DOSE MINIMALE AGREGANTE ET DU POURCENTAGE D'INHIBITION.

Nous désignerons par dose minimale agrégante la concentration d'inducteur nécessaire pour entraîner au moins 50% d'agrégation, sur le papier d'agrégomètre gradué de 0 à 100.

Le pourcentage d'inhibition est la différence entre le pourcentage d'agrégation de la courbe contrôle (du témoin ou du malade selon le cas), et celui de la courbe correspondante tracée en présence d'inhibiteur (schéma 16, p.72). Outre la traduction de l'effet recherché, cette expression des résultats par le pourcentage d'inhibition a pour but de minimiser l'effet de l'hypersensibilité des plaquettes du malade en présence d'inducteur (dose minimale agrégante), qui apparaît de façon manifeste sur le pourcentage d'agrégation.

III - 6. EXPLOITATION STATISTIQUE

Les conditions des préparatifs, étant difficilement reproductibles d'une manipulation à l'autre, les résultats ne peuvent être interprétés que par comparaison malade et témoin du même jour, une concentration identique d'inducteur (collagène 2,5 µg/ml) et d'inhibiteur (PGI_2 , microsomes, PGE_1 , PGD_2) étant alors utilisée pour l'un et l'autre. Une telle interdépendance des deux groupes (malades et témoins) ainsi créée par les conditions mêmes des tests, nous a amené à interpréter les résultats, en tenant compte de l'appariement, afin de diminuer les variations possibles à l'intérieur de chaque groupe.

La comparaison des deux séries appariées (témoins et malades) se correspondant donc par couple, s'est faite en confrontant chaque valeur trouvée chez le malade à celle de l'un des témoins. Pour cela, il a été procédé comme suit, pour les pourcentages d'inhibition ou les doses minimales agrégantes :

- Soit n le nombre de couples testés.

- Soit X_1 chaque valeur du malade.

- Soit X_2 chaque valeur du témoin.

La différence pour chaque couple est : $d = X_2 - X_1$

- Soit $T_1 = \sum_{i=1}^n d_i = \sum (X_2 - X_1)$

- Soit $T_2 = \sum_{i=1}^n d_i^2 = \sum [(X_2 - X_1)^2]$

La moyenne des d_i est :

$$\bar{X} = \frac{T_1}{n} = \frac{\sum (X_2 - X_1)}{n}$$

La variance des d_i est :

$$Sd^2 = \frac{T_2 - \frac{T_1^2}{n}}{n - 1}$$

La variance de $\bar{X}$ est :

$$S_{\bar{X}}^2 = \frac{Sd^2}{n}$$

Nous rappellerons que l'écart type est la racine carrée de la variance
soit :

$$\sigma = \sqrt{Sd^2}$$

Si la différence trouvée, entre les malades et les témoins, est significative, la moyenne des différences ($\bar{X}$), doit être très différente de zéro.

On est ramené à la comparaison d'une moyenne à une valeur théorique.

Soit :

$$t = \frac{\bar{X} - 0}{S \bar{X}}$$

La valeur de t doit être comparée à celle lue dans la table de student à $n - 1$ degrés de liberté (ν).

En biologie, la significativité apparaît pour une valeur de P inférieure à 0,05.

Les pourcentages d'inhibition seront notés : P.I.

Si "n" est le nombre de sujets testés (ou malades, ou témoins), on désignera les moyennes des pourcentages d'inhibition par m_1 chez les témoins par m_2 chez les malades, et on aura :

$$m_1 = \frac{\Sigma \text{ P.I. (témoins)}}{n'}$$

$$m_2 = \frac{\Sigma \text{ P.I. (malades)}}{n'}$$

Avec $n = n'$

$$\bar{X} = \frac{\Sigma [\text{ P.I. (témoins) - P.I. (malades) }]}{n}$$

Les doses minimales agrégantes seront notées : D.M.A.

Les moyennes des doses minimales agrégantes seront désignées de la même manière (m_1 chez les témoins, et m_2 chez les malades). On aura ainsi :

$$m_1 = \frac{\Sigma \text{ D.M.A. (témoins)}}{n'}$$

$$m_2 = \frac{\Sigma \text{ D.M.A. (malades)}}{n'}$$

Avec $n = n'$

$$\bar{X} = \frac{\Sigma [\text{ D.M.A. (témoins) - D.M.A. (malades) }]}{n}$$

RESULTATS.

I - ETUDE ANALYTIQUE.

I - 1. OBSERVATIONS DES MALADES.

De façon à exposer clairement les différents renseignements concernant les malades, ceux-ci seront regroupés sous forme de deux tableaux, se rapportant chacun à un groupe de six malades.

L'un mentionnera des renseignements divers (pathologie associée, tabagisme..) la date de début de la maladie, et les complications éventuelles (oculaires, cardiovasculaires, rénales ou neurologiques).

L'autre fournira des données sur la date des tests, sur l'état civil du patient (âge, sexe, référence du dossier et/ou de l'hôpital le suivant), des indications sur le traitement (type et dose d'insuline), sur l'équilibre de la maladie, et sur le régime déterminé par enquête diététique à l'hôpital et qui serait susceptible d'être suivi au domicile du malade. Nous préciserons dans certains cas les valeurs du dosage du cholestérol HDL plasmatique.

Il est à noter que l'ensemble des malades ne possède pas toutes ces informations ; une ligne sous le nom du malade sera réservée pour celles se rapportant au témoin.

D'autre part, bien que les malades n'avaient pas en général de complications infectieuses évolutives, le cas échéant elles seront mentionnées dans la colonne "renseignements divers".

La signification des abréviations employées dans ces tableaux figurera en première page.

Pour admettre l'existence d'une complication, nous avons retenu des critères cliniques ou paracliniques simples sans réaliser systématiquement une mesure de conduction nerveuse, une biopsie rénale ou une angiofluorographie rétinienne.

Dans la plupart des cas, l'ophtalmoscopie (fond d'oeil) est le seul examen fournissant des indices sur l'état oculaire.

La fonction rénale a été évaluée par la créatininémie en micro-moles par litres, et par l'albuminurie de 24 heures, en grammes par 24 heures.

Le système vasculaire a été apprécié par la palpation des pouls, l'auscultation des artères, et par le signe du lacet.

Le système neurologique a été testé essentiellement par la recherche des réflexes, mais également par l'existence de troubles trophiques.

En ce qui concerne les critères d'appréciation de l'équilibre du diabète, nous avons utilisé le dosage de l'hémoglobine glycosylée, et dans la mesure du possible, le poids, la taille, les valeurs d'une glycémie à jeun et d'une glycosurie de 24 heures qui paraissaient être les plus représentatives des valeurs moyennes notées chez chaque sujet. Le bilan sera parfois complété par une glycémie de 11 heures, le jour du test, au moment de la prise de sang, parfois couplée à un insulinémie[§] .

Nous préciserons le cas échéant les valeurs respectives approximatives en kilocalories, des glucides, lipides et protéines, apportés dans l'alimentation chez le malade.

§ L'insulinémie a été effectuée par le Dr. COHEN dans le Service du Pr. BIZOLLON selon la technique de "Hales et Randle" (technique radioimmunologique utilisant un double anticorps pré-précipité).

O B S E R V A T I O N S .

ABREVIATIONS UTILISEES.

<i>Ant</i>	= Antécédents.
<i>Chol</i>	= Cholesterol.
<i>F</i>	= Féminin.
<i>G</i>	= Glucides.
<i>Glyc</i>	= Glycémie (à jeun ou à 11 h.) ou Glycosurie (par 24 h.)
<i>Hb</i>	= Hémoglobine.
<i>L</i>	= Lipides.
<i>M</i>	= Masculin.
<i>Neurol</i>	= Neurologiques.
<i>P</i>	= Poids.
<i>Pt</i>	= Protéines.
<i>T</i>	= Taille.
<i>V.S.</i>	= Vitesse de sédimentation.

TABLEAUX 1 ET 2.

TABLEAUX 3 ET 4.

SUJETS TESTES	DATE DES TESTS	ETAT CIVIL			INSULINE			EQUILIBRE DU DIABETE							REGIME			CHOL HDL mmoles/ litre
		AGE	SEXE	N° DOSSIER SERVICE SOIGNANT	TYPE	DOSE UI/JOUR	DOSAGE (µu/ml)	P (Kg)	T (cm)	GLYC A JEUN mmoles / l	GLYC 11 H	GLYC / 24 H mmoles	Hb GLYCOSYLEE	Pt (Kcal)	L (Kcal)	G (Kcal)		
Go...	13-03-79	22	F	8048 Antiquaille	MZN	32		49	163			120	13,4 %	432	864	1100	1,85	
T 7		20	F															
La...	22-03-79	40	F	1187 Antiquaille	Durasuline	30		52	168	5,35		24	13,53 %				1,74	
T 8		7	F															
Fa...	27-03-79	43	F	9904 Antiquaille	MZN	27		64	166	14,3		155		298	501	344	2,44	
T 9		41	F															
Fo...	5-04-79	20	F	11711 Antiquaille	Semi lente mono composée	32 +	103,6	65	167		3,3	7,35	11,5 %	332	468	604	1,22	
T 10		21	F			13	19				5							
Ba...	26-04-79	38	M	794 Antiquaille	Monotard	50		65,5	164		4	66,6	11,11 %	386	747	1088	1,42	
T 11		31	M				17,2				4,9		6,96 %					
Me...	3-05-79	27	M	3837 Antiquaille	10 + IPZ	28 +	781	62	167	11,2		14,98	11,33 %	202	566	490	1,45	
T 12		25	M			28	29,2						6,43 %				1,07	

TABLEAUX 5 ET 6.

SUJETS TESTES	DATE DES TESTS	ETAT CIVIL			INSULINE				EQUILIBRE DU DIABETE							REGIME			CHOL HDL mmoles/ litre
		AGE	SEXE	N° DOSSIER SERVICE SOIGNANT	TYPE	DOSE UI/JOUR (µu/ml)	P (Kg)	T (cm)	GLYC A JEUN mmoles /l	GLYC 11 H	GLYC / 24 H mmoles	Hb GLYCOSYLEE	Pt (Kcal)	L (Kcal)	G (Kcal)				
Au...	8-05-79	20	F	11920 Antiquaille	Monotard	32 +	281	163	10,5		147	11,74 %	336	612	644	1,25			
T 13		20	F			32	13,8					5,77 %				1,79			
Gr...	10-05-79	19	F	11641 Antiquaille	Rapitard	16 +	53	154	14	5,4	100	12,42 %	305	405	480	1,60			
T 14		21	F			12	15,5			5		6,98 %				2,02			
Ja...	31-05-79	36	F	9903 Croix Rousse	10 +	10 +	130			10		9,74 %				1,65			
T 15		41	F		IPZ	30	31			6,1		6,48 %				1,27			
No...	14-06-79	30	M	107202 Croix Rousse	10 +	20 +	133,9			15		14,04 %				1,13			
T 16		29	M		IPZ	45	16,4			5,5		8,44 %				1,44			
Ja...	19-06-79	22	F	7077 Antiquaille	Actrapid +	2 +	44,2	166	3,70	7,1	300	10,55 %		1500 ?	720	1,28			
T 17		26	F		IPZ	35	13,4					4,92 %				1,79			
Pr...	26-06-79	38	F	9355 Croix Rousse	Insuline retard +	12 +	47,4									2,14			
T 18		35	F		IO	35	12,4									1,41			

TABLEAUX 7 ET 8.

TABLEAUX 9 ET 10.

I - 2. RESULTATS DE L'ETUDE DE L'AGREGATION PLAQUETTAIRE CONCERNANT LES COUPLES MALADE-TEMOIN.

I - 2.1. DOSES MINIMALES AGREGANTES

Sur les tableaux 11, 12, 13, nous pouvons voir le détail des valeurs des doses minimales agrégantes chez les malades et chez les témoins, en PRP ou en plaquettes isolées.

Le tableau 14 interprète ces valeurs. Lorsqu'il s'agit de PRP, il existe une différence significative entre les témoins et les malades, aussi bien avec l'arachidonate de sodium (en mM) ($P < 0,01$; $n = 30$) qu'avec le collagène (en $\mu\text{g/ml}$) ($P < 0,01$; $n = 15$).

En ce qui concerne les plaquettes isolées, la différence n'est pas significative pour l'arachidonate (en μM). Pour le collagène (en $\mu\text{g/ml}$), bien que la probabilité d'erreur soit plus faible que pour l'arachidonate ($0,05 < P < 0,10$), la différence n'est pas significative ; mais il est à noter que sur une série de couples (témoin-malade) numériquement plus élevée, mais ne comprenant pas dans sa totalité l'étude de la PGI_2 et ne pouvant pas rentrer dans le cadre de cet exposé, la différence était significative pour le collagène, en plaquettes isolées ($P < 0,05$; $n = 15$) (121).

I - 2.2. ACTION DE LA PGI_2 SUR L'ACTIVITE PLAQUETTAIRE.

Les tableaux 11, 12, et 13 exposent les résultats des pourcentages d'inhibition trouvés en PRP et en plaquettes isolées, chez les malades et les témoins ; Les tableaux 15, 16 les interprètent sur le plan statistique.

Les différences obtenues en présence de la PGI_2 entre le malade et le témoin sont en faveur d'une moindre inhibition de l'agrégation plaquettaire chez le malade, pour une même concentration d'inhibiteur utilisée le jour du test chez chacun des sujets. Le détail des résultats obtenus en PRP et en plaquettes isolées apparaîtront plus loin sur des tableaux récapitulatifs. La différence apparaît très significative en PRP ($P < 0,001$; $n = 30$) (Tableau 15). En plaquettes isolées on a $P < 0,01$ pour $n = 23$ (Tableau 16).

I - 2.3. ACTION DES MICROSOMES SUR L'ACTIVITE PLAQUETTAIRE.

Les résultats globaux montrent également une différence de comportement plaquettaire entre les deux groupes de sujets testés, grossièrement superposable

à celle de la PGI_2 , en PRP ou en plaquettes isolées (Tableaux 11, 12, 13). Mais, dans certains cas, l'interprétation peut être délicate, la différence d'agrégation existant avec la PGI_2 , mais pas avec les microsomes, ou bien même une meilleure inhibition se produisant chez le malade avec les microsomes, en même temps que le témoin, lui, répond mieux à la PGI_2 . Ce phénomène peut être dû à l'utilisation possible et variable de la PGH_2 plaquettaire par l'activité prostacycline synthétase des microsomes, témoignant alors de l'hyperactivité plaquettaire du malade et du passage exagéré de la PGH_2 hors de la plaquette. De toute façon, il ne s'agit pas d'une moindre disponibilité des endoperoxydes plaquettaires pour la prostacycline synthétase comme notre projet le laissait supposer.

Les tableaux 15 et 16 interprètent ces résultats qui apparaissent significatifs ($P < 0,02$; $n = 22$ en PRP et $P < 0,02$; $n = 12$ en plaquettes isolées).

I - 2.4. ACTION DE LA PGD_2 et de la PGE_1 SUR L'ACTIVITE PLAQUETTAIRE.

Les tableaux 11, 12, et 13, rapportent de la même façon les valeurs des pourcentages d'inhibition. Les tableaux 14 et 15 résument l'interprétation statistique.

L'inhibition de l'agrégation plaquettaire par la PGE_1 est inférieure chez le malade à celle trouvée chez le témoin, lorsqu'il s'agit de PRP, ($P < 0,01$; $n = 13$) alors que la différence n'est plus significative en utilisant les plaquettes isolées, mais on retiendra le faible nombre de sujets testés ($n = 6$).

Pour la PGD_2 , bien que son action semble parallèle à celles de la PGI_2 et de la PGE_1 , comme le montrent les pourcentages d'inhibition sur les tableaux récapitulatifs (Tableaux 11, 12, 13), la différence du comportement plaquettaire entre malades et témoins n'apparaît pas significative pour le nombre de sujets étudiés, aussi bien avec utilisation de PRP ($n = 9$) que de plaquettes isolées ($n = 6$) (Tableaux 15 et 16).

I - 3. ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EFFET PLAQUETTAIRE DE L'INSULINE

Bien qu'Hassenein ait décrit en 1972 une diminution de l'agrégation produite par l'ADP en présence de faibles doses d'insuline (0,1 unité d'insuline/kg) (84), il semble que l'effet de cette hormone sur la plaquette soit complexe et non encore élucidé.

Au laboratoire, il a paru que l'insuline pouvait fréquemment s'opposer à l'agrégation plaquettaire par la prostacycline (PGI_2) (dans 50% des cas environ sur plasma frais). Dans certains cas même, elle donne une réponse sur l'agrégation inverse de celle donnée par la PGI_2 , d'action très souvent instable sur PRP fraîchement préparé (depuis moins de 3 ou 4 heures).

Les schémas 14 et 15, résument ces faits, qui ne demandent qu'à être confirmés et approfondis.

La courbe (a) sert de contrôle à toutes les autres. Tout se passe comme s'il existait une compétition ou une régulation au niveau des récepteurs plaquettaires entre deux substances (l'insuline et la PGI_2), chacune ayant une action instable.

Ces effets de l'insuline ne se produisent pas sur un PRP préparé depuis plus de 4 heures ; de même, l'action de la PGI_2 est devenue beaucoup plus stable.



Schéma 14. AGREGATIONS DE PLASMA FRAIS, RICHE EN PLAQUETTES. INDUCTION AU COLLAGÈNE (2,5 $\mu\text{g/ml}$).

OPPOSITION DE L'INSULINE A L'ACTION DE LA PGI₂.

- (a) : PRPc + "Plain Tyrode" + 2 μl ethanol + Collagène.
- (b) : PRPc + 80 $\mu\text{u/ml}$ insuline + 2 μl ethanol + Collagène.
- (c) : PRPc + 1 ng/ml PGI₂ + Collagène.
- (d) : PRPc + 80 $\mu\text{u/ml}$ insuline + 1 ng/ml PGI₂ + Collagène.

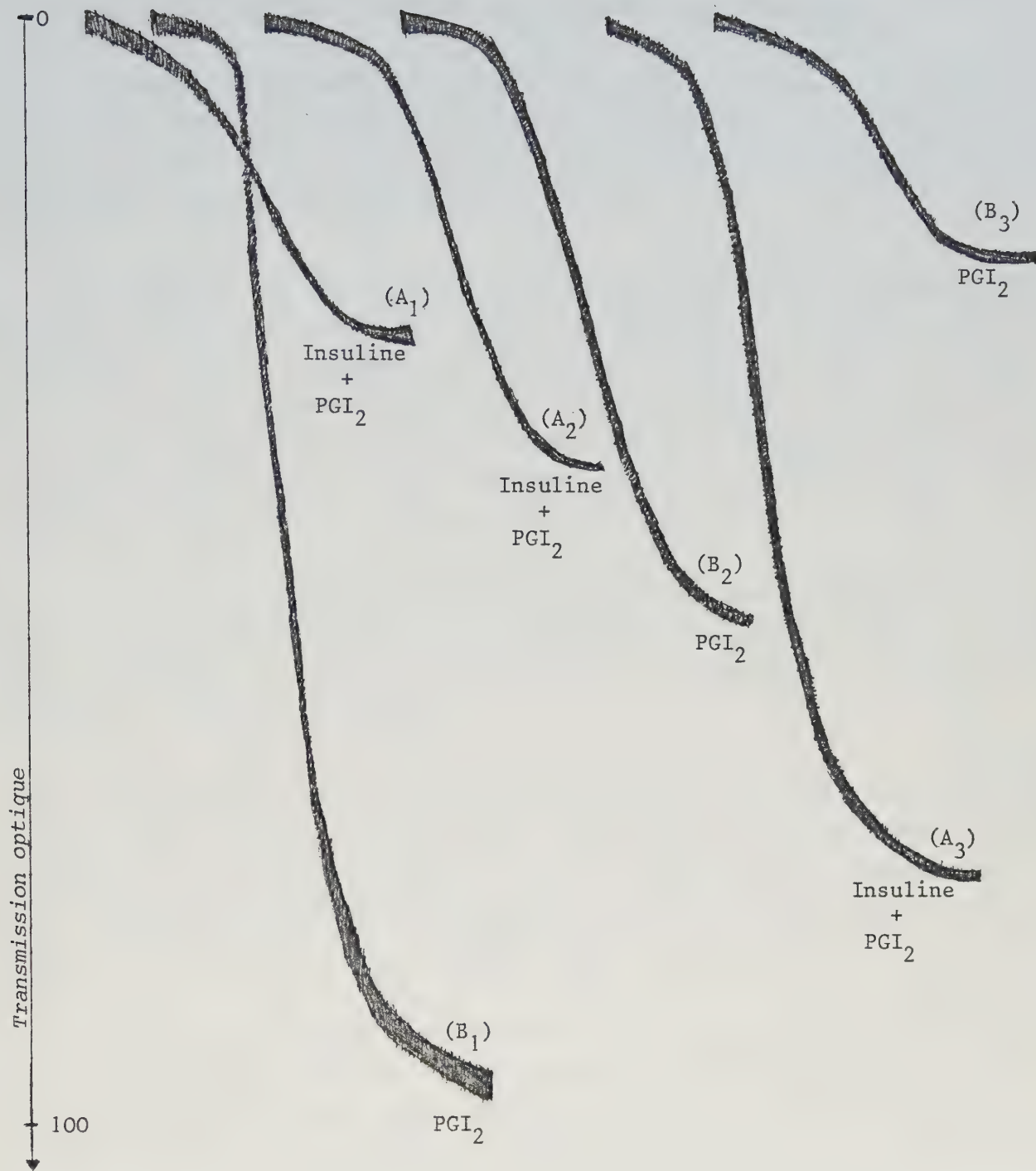


Schéma 15. AGREGATIONS DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES. INDUCTION AU COLLAGÈNE (2,5 µg/ml).

EFFET INCONSTANT DE LA PGI₂ SUR PRP FRAIS.

OPPOSITION DE L'INSULINE A L'ACTION DE LA PGI₂.

A₁ = A₂ = A₃ : PRPc + 80 µu/ml insuline + 1 ng/ml PGI₂ + Collagène.

B₁ = B₂ = B₃ : PRPc + 1 ng/ml PGI₂ + Collagène.

II - SCHEMA ET TABLEAUX RECAPITULATIFS DES RESULTATS.

Le schéma 16 représente une moyenne comparative des résultats d'agrégation obtenus avec le PRP des diabétiques par rapport à ceux obtenus avec le PRP des témoins. Ce schéma montre la différence de comportement plaquettaire en présence d'inhibiteur, entre les deux catégories de sujets.

Les tableaux 11, 12, et 13, rapportent les valeurs des pourcentages d'inhibition, obtenus chez les malades et chez les témoins par utilisation de PRP ou de plaquettes isolées, en présence de microsomes, de PGI_2 , de PGE_1 , ou de PGD_2 , ainsi que les doses minimales agrégantes à l'arachidonate de sodium et au collagène.

Chaque malade sera désigné par les deux premières lettres de son nom, le témoin correspondant par la lettre T affectée d'un indice (1 à 30), selon l'ordre chronologique dans lequel les tests ont été effectués.

Le tableau 14 montre les moyennes des doses minimales agrégantes chez les témoins (m_1) et chez les malades (m_2), en PRP et en plaquettes isolées. Il indique aussi la différence des doses minimales agrégantes des témoins et des malades ($\bar{X}$), ainsi que leur analyse statistique.

Les tableaux 15 et 16, situent les moyennes des pourcentages d'inhibition chez les témoins (m_1) et chez les malades (m_2), résultant de l'agrégation au sein de PRP (tableau 15), ou de plaquettes isolées (tableau 16). Ils indiquent également la moyenne des différences de pourcentage d'inhibition ($\bar{X}$) entre les deux catégories de sujets, ainsi que leur exploitation statistique.

Le tableau 17, rassemble les moyennes de certaines constantes indiquées dans les observations (tableaux 1 à 10), et qui sont représentatives des groupes de sujets testés (sexe, âge, poids, taille, ancienneté du diabète, dosage de l'insuline, hémoglobine glycosylée, cholestérol HDL, et pourcentage de protéines, de lipides, et de glucides, dans la ration alimentaire quotidienne du malade).

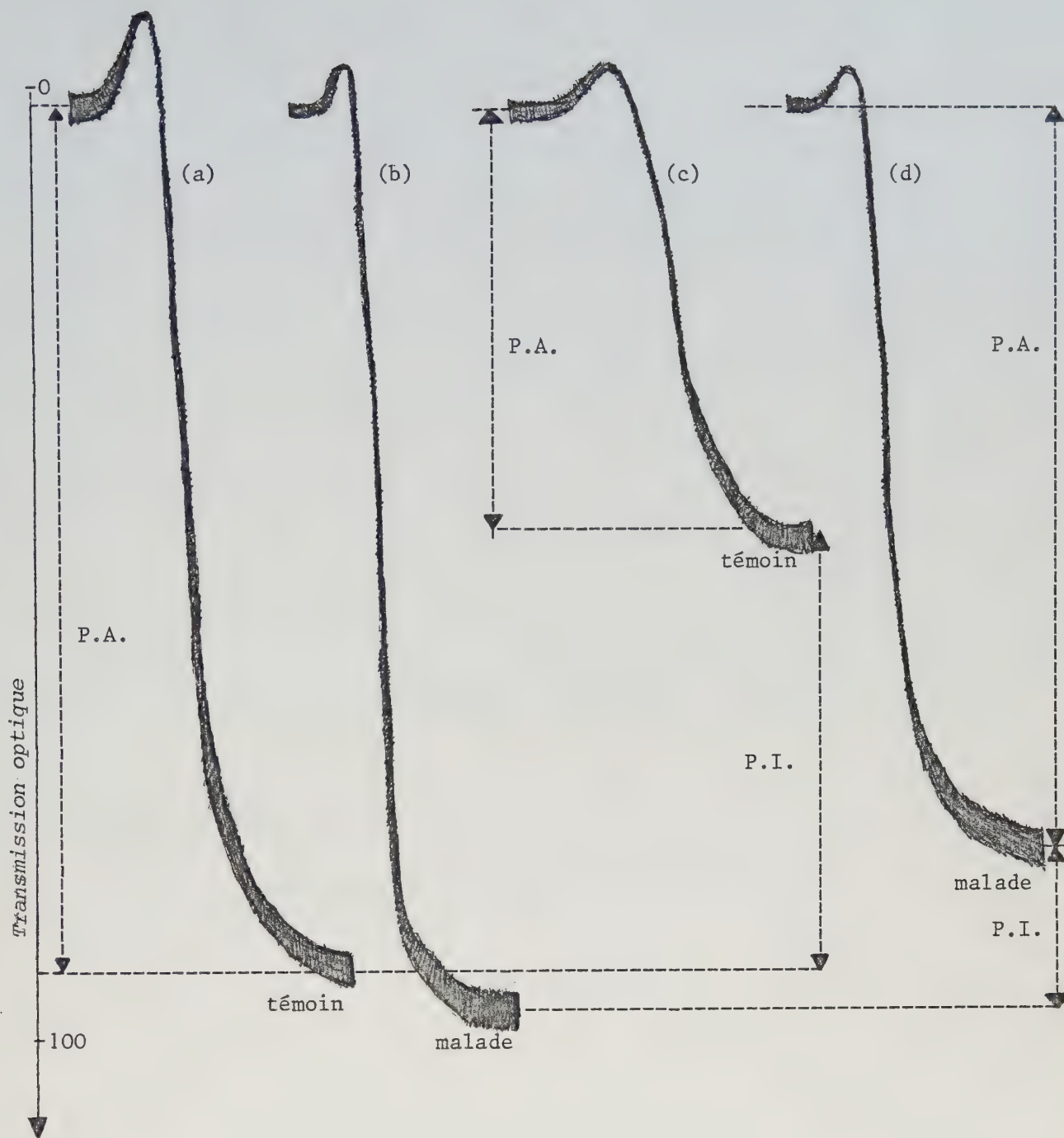


Schéma 16. AGREGATIONS DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES.

INDUCTION AU COLLAGÈNE (2,5 $\mu\text{g/ml}$).

REPRESENTATION MOYENNE COMPARATIVE DES POURCENTAGES D'INHIBITION (P.I.) DES MALADES ET DES TÉMOINS.

- | | | | |
|--|-----------|---------------|--|
| (a) : PRPc (T) + 2 μl ethanol + Collagène | (témoin). | Inhibiteurs { | microsomes
PGI ₂
PGE ₁
PGD ₂ |
| (b) : PRPc (M) + 2 μl ethanol + Collagène | (malade). | | |
| (c) : PRPc (T) + "inhibiteur" + Collagène | (témoin). | | |
| (d) : PRPc (M) + "inhibiteur" + Collagène | (malade). | | |

P.A. = Pourcentage d'agréation ; P.I. = Pourcentage d'inhibition.

TABLEAUX 11, 12 et 13.

ABREVIATION UTILISEE.

P.I. = Pourcentage d'inhibition.

MALADES ET TENDONS	PLASMA RICHE EN PLAQUETTES						PLAQUETTES ISOLEES					
	P.I. Mic	P.I. PGI ₂	P.I. PGE ₁	P.I. PGD ₂	Dose minimale agrégante							
					Arachidonate de sodium	Collagène						
La...	6	2,5			0,3 mM		P.I. Mic	P.I. PGI ₂	P.I. PGE ₁	P.I. PGD ₂	Arachidonate de sodium	Collagène
T 1	38,5	44,5			0,35							
Re...	44,5	16,8			0,15						1,5	
T 2	62,5	43,8			0,20						0,5	
Br...	56,3	43,1			0,20							
T 3	64,9	49,2			0,30							
Fr...	17	9,7			0,30						2	
T 4	33	70,5			0,35						2,5	
Bo...	0	0			0,20			12,6			2,5	
T 5	15,3	11			0,25			7,2			2	
Mo...	49,9	0			0,20		59,8	13,9			1,5	
T 6	20,5	38,6			0,40		70,6	33			2	
Go...	44,8	0			0,30		1,9	27,3			1,5	
T 7	39,2	21,3			0,50		29,2	19,5			1,5	
La...	63,2	54,1			0,45						4,5	
T 8	77,2	5,6			0,70						4	
Fa...		17,9			0,15			75,2			1,5	
T 9		72,5			0,30			65,7			2,5	
Fo...	47,3	52,5			0,25			57,1			0,25	
T 10	69,8	72,4			0,25			65			2	

MALADES ET TEMOINS	PLASMA RICHE EN PLAQUETTES					PLAQUETTES ISOLEES				
	P.I.	P.I.	P.I.	P.I.	P.I.	P.I.	P.I.	Dose minimale agrégante		Collagène
	Mic	PGI ₂	PGE ₁	PGD ₂	Arachidonate de sodium	Mic	PGI ₂	PGD ₂	Arachidonate de sodium	
Ba...	65,7	42,8			0,125	47,5	33,6		2	0,312
T 11	38,3	41,1			0,45	66	54,5		3	0,937
Me...	11,8	27,6			0,15	43	11,5		2,5	0,360
T 12	63,9	64			0,30	64,4	57		3,5	0,360
Au...	11	15,5			0,15	26,8	31,4		0,75	0,048
T 13	58,6	43,1			0,20	62,2	67,1		1,25	0,187
Gr...	51,3	18,6			0,22	44,7	37,6		1,5	0,17
T 14	18,5	22,3			0,27	57,1	49,5		1,5	0,35
Ja...	29,1	18,7			0,15	62,9	79,4		2	0,2
T 15	34	25,4			0,2	41,5	68,3		2	0,6
No...	7,8	9,3			0,25				2	0,25
T 16	67,1	59,1			0,30				2	1,25
Ja...	8,5	4,4			0,075	26,1	17,7		1,5	1
T 17	54,6	54,7			0,15	57,1	49,1		1,5	0,6
Pr...	1,1	13,9	36,4		0,22	51,3	46,2		1,75	0,18
T 18	50,5	41,4	80		0,25	68	56,4		1,5	0,32
Vf...	14	19,9	38,4	22,9	0,23	36	42,8		2,5	0,35
T 19	47,2	65,6	86,4	60,2	0,30	65,4	53,1		2,5	0,50
Bo...	76,9	31,2	67,6		0,26	73,7	53,1		1,3	0,4
T 20	64,9	58,6	72,5		0,32	73,8	47,7		2,3	0,27

MALADES ET TENDONS	PLASMA RICHE EN PLAQUETTES						PLAQUETTES ISOLEES				
	P.I.	P.I.	P.I.	P.I.	Dose minimale agrégante		P.I.	P.I.	P.I.	Dose minimale agrégante	
										Arachidonate de sodium	Collagène
	Mic	PGI ₂	PGF ₁	PGD ₂							
Th...	39	5,4	52,1	45,3	0,35	0,30				3	
T 21	45,9	16,4	60,9	56,5	0,30	0,80				1,5	
Ch...	1,2	31,3	10,0		0,20	0,125				2	0,07
T 22	6	32,9	11,2		0,20	0,20				3,2	0,2
Bl...	1,4	11,1	18,5		0,13	0,15				3,2	0,25
T 23	20,3	47,3	39,8		0,26	0,40				3	0,3
Th...		0	0	0	0,20			0	4,9	7,1	
T 24		36,3	67	57,4	0,40			60,9	48,7	61,1	
St...		22,5	29	72,1	0,45			0	71,9	52	
T 25		27,9	32,4	51,9	0,50			46,9	65	62,3	
Z1...		57,8	52,7	46,6	0,60			76,3	71,3	67,7	
T 26		49,4	44,9	11,3	0,50			62,7	57,5	63,4	
Vo...		18,2	27,8	19,1	0,45	0,75		33,1	14,9	29,6	
T 27		67,6	68,4	50,6	0,45	0,75		55,3	46,3	45,3	
So...		0	5	22,9	0,75	0,62		10	4,9	33,3	
T 28		78	62,5	70,4	0,40	0,75		68,4	62,7	61,6	
Ch...		5,4	23,1	8,9	0,40			31	0,5	32,6	
T 29		80,1	80,1	67,5	0,35			53,2	34,6	56,3	
Ol...		29,4	47,3	26,4	0,30			65,2		70,7	
T 30		64,4	63,5	53,7	0,30			52,8		53,9	

A	P L A S M A R I C H E E N P L A Q U E T T E S (P R P) .				
	INDUCTEURS	TEMOINS	MALADES	$\bar{X} \pm \sigma$	SIGNIFICATIVITE
		m_1	m_2		
	Arachidonate de sodium (n = 30)	0,33 mM	0,27 mM	$0,06 \pm 0,11$	$P < 0,01$
	Collagène (n = 15)	0,40 µg/ml	0,26 µg/ml	$0,13 \pm 0,13$	$P < 0,01$
B	P L A Q U E T T E S I S O L E E S .				
	INDUCTEURS	TEMOINS	MALADES	$\bar{X} \pm \sigma$	SIGNIFICATIVITE
		m_1	m_2		
	Arachidonate de sodium (n = 21)	2,17 µM	1,96 µM	$0,21 \pm 0,77$	$0,20 < P < 0,30$ N.S.
§	Collagène (n = 12)	0,48 µg/ml	0,29 µg/ml	$0,19 \pm 0,35$	$0,05 < P < 0,10$ N.S.

TABLEAU 14 . AGREGATIONS DE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES ISOLEES EN PRESENCE DE DOSES MINIMALES D'INDUCTEUR, CAPABLES D'INDUIRE AU MOINS 50% DE L'AGREGATION.

m_1 = Moyennes des doses minimales d'inducteur chez les témoins.

m_2 = Moyennes des doses minimales d'inducteur chez les malades.

$\bar{X}$ = Moyennes des différences des doses minimales agrégantes des témoins et des malades.

§ En fait la différence a été trouvée significative sur une série de malades numériquement plus élevée ($P < 0,05$; n = 15) (M. LAGARDE et Al).

INHIBITEURS	TEMOINS	MALADES	$\bar{X} \pm \sigma$	SIGNIFICATIVITE
	m_1	m_2		
Microsomes (n = 22)	45,03	29,44	15,58 $\pm$ 26,53	P < 0,02
PGI ₂ (n = 30)	46,83	19,32	27,51 $\pm$ 26,42	P < 0,001
PGE ₁ (n = 13)	59,2	31,43	27,76 $\pm$ 25,44	P < 0,01
PGD ₂ (n = 9)	53,27	29,35	23,92 $\pm$ 33,05	0,05 < P < 0,10 N.S.

TABLEAU 15 .

INDUCTION DE L'AGREGATION DE PRP PAR LE COLLAGENE. EFFET INHIBITEUR (EXPRIME EN POURCENTAGE) DE DIFFERENTS AGENTS PREINCUBES PENDANT UNE MINUTE.

m_1 = Moyenne des pourcentages d'inhibition des témoins.

m_2 = Moyenne des pourcentages d'inhibition des malades.

$\bar{X}$ = Moyenne des différences des pourcentages d'inhibition des témoins et des malades.

σ = Ecart type.

INHIBITEURS	TEMOINS	MALADES	$\bar{X} \pm \sigma$	SIGNIFICATIVITE
	m_1	m_2		
Microsomes (n = 12)	58,11	43,56	14,57 $\pm$ 16,86	P < 0,02
PGI ₂ (n = 23)	51,41	35,77	15,64 $\pm$ 22,59	P < 0,01
PGE ₁ (n = 6)	52,46	28,06	24, 4 $\pm$ 28,54	0,05 < P < 0,10 N.S.
PGD ₂ (n = 7)	57,7	41,85	15,84 $\pm$ 23	0,10 < P < 0,20 N.S.

TABLEAU 16.

INDUCTION DE L'AGREGATION DE PLAQUETTES ISOLEES PAR LE COLLAGENE. EFFET INHIBITEUR (EXPRIME EN POURCENTAGE) DE DIFFERENTS AGENTS PREINCUBES PENDANT UNE MINUTE.

m_1 = Moyenne des pourcentages d'inhibition des témoins.

m_2 = Moyenne des pourcentages d'inhibition des malades.

$\bar{X}$ = Moyenne des différences de pourcentages d'inhibition des témoins et des malades.

σ = Ecart type.

	SEXE		AGE	POIDS (Kg)	TAILLE (Cm)	ANCIENNETE DU DIABETE	DOSAGE INSULINE	Hb A ₁ C	CHOLESTEROL HDL	REGIME		
	F	M								Pt	L	G
TEMOINS	16	14	29 ans (21 à 59) n = 28				17,7 ± 6,36 n = 13	6,11 % ± 1,13 n = 11	1,66 ± 0,67 n = 12			
DIABETIQUES	16	14	29,2 (19 à 50) n = 30	60,5 ± 10,2 n = 22	166,3 ± 7,4 n = 22	12,4 ans (0,4 à 32) n = 27	226,7 ± 236,4 n = 14	10,84 % ± 2,3 n = 21 P < 0,001	1,53 ± 0,42 n = 24	19,4 % n=20	37,3 % n =20	43,2 % n = 20

TABEAU 17.

MOYENNES CARACTERISTIQUES DES SUJETS PARTICIPANT A CETTE ETUDE.

Pt = Protéines. L = Lipides. G = Glucides.
HB A₁ C = hémoglobine glycosylée.

III - COMMENTAIRES.

Le groupe de sujets diabétiques étudié, est numériquement trop faible pour pouvoir dégager des sous-groupes en fonction de l'ancienneté du diabète, de son équilibre, de la présence de complications, ou pour faire une corrélation entre les pourcentages d'inhibition de l'agrégation plaquettaire et le régime.

Les tentatives à ce sujet, n'ont pas montré de différence significative entre les personnes présentant un diabète ancien ou récent, ou entre les malades ayant des complications et ceux qui en sont préservés ou tout au moins qui ne présentent pas plus d'une complication mineure (signe du lacet légèrement positif, créatininémie un peu élevée).

Il semble que l'on puisse tout de même retenir l'idée que l'hyperactivité plaquettaire existe à un stade précoce, comme le montre la comparaison des pourcentages d'inhibition des malades diabétiques depuis moins de 5 ans et des témoins correspondants.

Une autre constatation est celle concernant le régime et le déséquilibre créé par une restriction en glucides, au profit d'une augmentation de la ration lipidique. Ceci pourrait avoir, comme nous le verrons une importance dans l'activation plaquettaire.

Les dosages d'insuline effectués, indiquent une différence importante entre malades et témoins qui pourrait là aussi jouer un rôle non négligeable.

IV - AUTRES RESULTATS DU PROTOCOLE CONCERNANT LES DIABETIQUES.

Il a été trouvé par ailleurs :

- Une augmentation de la biosynthèse des prostaglandines plaquettaires et des composés apparentés, à partir d'arachidonate endogène, après stimulation des plaquettes isolées par la thrombine (TXB_2 , HETE ; $n = 27$ à 29 , $P < 0,05$), la synthèse à partir d'arachidonate exogène a paru normale ($\text{PGF}_2\alpha$, PGE_2 , TXB_2 , HHT, HETE ; $n = 9$ à 12 , N.S.). Ceci suggère une augmentation de l'activité phospholipase des plaquettes diabétiques, mais des activités prostaglandine synthétase et lipoxycgénase normales.

- Une augmentation de la demi-vie du thromboxane A_2 , en présence de plasma pauvre en plaquettes provenant de sujets diabétiques, par rapport à celle déterminée en présence de plasma pauvre en plaquettes provenant des témoins ($n = 9$ à 12 , $P < 0,05$). Ceci pourrait contribuer à expliquer l'hyperagrégabilité du PRP diabétique à l'arachidonate.

- L'absence de différence significative, entre les concentrations plasmatiques d'acides gras non estérifiés des malades, et celles des témoins ($n = 23$).

D'autres études faites au laboratoire, ont montré une modification de la demi-vie du TXA_2 avec la quantité d'acides gras non estérifiés liés à l'albumine (Lagarde et al, soumis à la publication). Or la plupart des acides gras sont liés à l'albumine (208, 209). Mais leur taux normal chez le diabétique, mentionné également par Kwaan (116), nous a fait soulever l'hypothèse de la relation entre la durée de vie du thromboxane et la glycosylation possible de l'albumine montrée par plusieurs équipes (47, 52) (travaux en cours).

DISCUSSION

Nous avons vu que l'activation plaquettaire s'accompagnait de la formation de prostaglandines et de composés apparentés.

Une hypersensibilité des plaquettes diabétiques aux agents agrégants a été rapportée par Bern, et bien d'autres auteurs (14).

Récemment, certains ont montré une augmentation de produits "PGE-like", chez les diabétiques, après stimulation en PRP de l'activité plaquettaire par différents agents inducteurs (77). Cependant la spécificité de la technique radioimmunologique utilisée peut être discutée ; Le dosage ainsi effectué, pourrait englober à côté des PGE, d'autres substances comme le PGF, ou les PGD. D'autre part cette augmentation de produits PGE-like n'est pas le reflet direct d'une synthèse accrue de prostaglandines plaquettaires et des substances apparentées notamment le TXA_2 . Néanmoins la même équipe a décrit une diminution de sensibilité des plaquettes de sujets diabétiques à l'imidazole, un inhibiteur de la thromboxane synthétase (37), dont la spécificité n'a pas été démontrée.

Ces faits sont en tout cas en faveur d'une hyperactivité plaquettaire chez le diabétique, et coïncideraient avec la diminution possible de production de prostacycline, un puissant inhibiteur physiologique synthétisé par les cellules endothéliales (53, 200). Celles-ci, incubées dans un milieu hyperglucosé, auraient une activité "prostacycline like" abaissée (184). Cette diminution de synthèse pourrait ainsi s'expliquer par des modifications métaboliques des cellules endothéliales, dues au glucose et peut-être à la forte teneur des plasmas diabétiques en peroxydes lipidiques (197), capables, nous l'avons vu, d'inhiber la prostacycline synthétase. La présence de lésions vasculaires avec disparition du revêtement endothélial peut encore concourir à la réduction de formation de prostacycline.

L'étude présentée ici, a été effectuée à partir d'un groupe de sujets témoins en bonne santé apparente, ainsi que d'un groupe de sujets diabétiques traités par l'insuline (lente et/ou semi-lente et/ou insuline ordinaire).

Les dosages d'insuline ont montré une différence souvent très importante entre l'insulinémie du malade et celle du témoin, pratiquées à la même heure.

L'action de l'insuline sur les plaquettes reste encore obscure ; pour certains, elle augmenterait le métabolisme du glucose, mais pourrait régulariser la fonction plaquettaire des diabétiques à doses physiologiques (223). En tout cas, depuis la découverte des récepteurs plaquettaires à l'insuline (223) il apparaît de façon manifeste que celle-ci peut jouer un rôle dans le métabolisme et la fonction plaquettaire. L'énergie des fonctions plaquettaires serait dérivée du

métabolisme du glucose sous l'influence de l'insuline. Les insulinémies trouvées élevées chez les malades pourraient expliquer en partie l'augmentation du métabolisme des plaquettes, et leur hyperfonctionnement. En outre il semble que cette hormone puisse, à doses supraphysiologiques, s'opposer dans certaines conditions au pouvoir inhibiteur de la prostacycline, peut être par compétition au niveau des sites ou par régulation métabolique pouvant intéresser l'adénylate cyclase membranaire. L'insuline pourrait entraîner une diminution de l'AMPc, et entraver du même coup l'action de la PGI_2 . Ces données restent à confirmer en particulier par les dosages de l'AMPc. De plus, le dosage de l'insuline ne tient pas compte de la formation d'anticorps par les malades, ni du fait que la technique est spécifique de l'insuline humaine. Or le traitement des malades consiste en l'apport d'insuline de porc ou de boeuf.

Pour ces raisons, les résultats concernant l'insuline et son rôle pathogénique éventuel doivent-ils être interpréter avec réserve.

L'emploi de prostacycline de synthèse, semble établir que le défaut d'inhibition de l'agrégation plaquettaire par les microsomes, chez les sujets diabétiques, ne révèle pas d'une diminution d'utilisation des endoperoxydes plaquettaires par la prostacycline synthétase, mais paraît plutôt lié à un état réfractaire des plaquettes aux prostaglandines inhibitrices (particulièrement, PGI_2 , mais également PGE_1 , et peut-être PGD_2).

Ceci pourrait être dû soit à une diminution des sites récepteurs, conséquence de la modification possible des glycoprotéines membranaires inhérente à la maladie, soit à la saturation des récepteurs plaquettaires aux prostaglandines, secondaire à un conflit entre la plaquette et la paroi vasculaire, et représenterait alors un mécanisme de défense.

De pareilles observations ont été décrites chez des sujets atteints de thromboses veineuses récidivantes ou de syndromes myéloprolifératifs (38). Ces malades possèdent un état réfractaire de leurs plaquettes à la PGD_2 mais pas à la PGE_1 , ni à la PGI_2 ; Ces deux dernières prostaglandines possèdent en effet des récepteurs plaquettaires différents de la PGD_2 (39, 200). L'incubation de plaquettes dans un milieu riche en PGD_2 , désensibilise la plaquette, de façon transitoire, à cette prostaglandine, qui perd alors provisoirement son activité (40).

Le nombre des cas étudiés chez les diabétiques ne nous permet pas encore de conclure sur la spécificité de cet état réfractaire à la PGI_2 et à la PGE_1 , épargnant ainsi la PGD_2 . Pour cela, une exploration numériquement plus importante et orientée sur l'AMPc s'impose.

A côté des récepteurs, toute la chaîne d'activation plaquettaire peut être atteinte. Tout d'abord, l'adénylate cyclase qui, chez les diabétiques, pourrait être inhibée par un facteur plaquettaire ou plasmatique. On pourrait imaginer que ce soit une stimulation accrue de la phosphodiesterase, qui contribue au maintien d'un taux bas d'AMPc. D'autres hypothèses peuvent reposer sur des anomalies du système tubulaire dense, ou encore sur des modifications du système contractile, la thrombasténine, site récepteur du calcium.

De telles éventualités deviendraient plus crédibles dans la mesure où la poursuite de notre étude confirmerait un état réfractaire à la fois à la PGI_2 et à la PGE_1 , mais aussi à la PGD_2 . Une perturbation concomitante de deux types de récepteurs serait peu probable.

En cas de modification des récepteurs, on pourrait concevoir chez les diabétiques qu'une faible stimulation de l'adénylate cyclase par les prostaglandines inhibitrices connues pour agir par une augmentation d'AMPc (73), soit à l'origine d'un taux plaquettaire d'AMPc particulièrement bas.

Or ce nucléotide est capable d'inhiber l'activité phospholipase plaquettaire (124), qui serait alors plus forte chez les diabétiques. Cette hypothèse rejoint la suggestion faite à propos de l'augmentation de la biosynthèse des prostaglandines à partir d'acide arachidonique endogène, avec synthèse exogène normale (autres résultats du protocole) ; on pourrait de cette façon expliquer la plus grande susceptibilité des plaquettes diabétiques à un inducteur tel que le collagène, agissant par libération d'acide arachidonique endogène et synthèse de prostaglandines. L'hyperagrégabilité au collagène pourrait également être due à une augmentation de la teneur en arachidonate dans les phospholipides membranaires des plaquettes des sujets diabétiques. Cette hypothèse est étayée par la constatation chez ces patients d'un régime riche en lipides, dépassant en général 35% de la ration calorique tout en ayant pour la plupart un bilan lipidique à jeun normal, et par les observations d'hyperagrégabilité après régime riche en acide arachidonique (201). On pourrait concevoir que les phospholipides sont à l'origine d'une libération excessive d'acide arachidonique devenant disponible pour la prostaglandine synthétase. De plus, l'hypersécrétion d'hormone de croissance dans le diabète, pourrait entraîner une mobilisation accrue de l'acide arachidonique au niveau des phospholipides membranaires. L'hypophysectomie serait d'autre part capable de corriger les anomalies plaquettaires (173, 174), en même temps qu'elle améliorerait dans certains cas la rétinopathie existant.

A l'inverse, l'hypersensibilité des plaquettes diabétiques aux agents inducteurs pourrait être à l'origine de leur état réfractaire vis à vis des

prostaglandines inhibitrices. De la même manière, elle pourrait expliquer chez le diabétique l'action réduite de l'imidazole, un inhibiteur de la thromboxane synthétase (37). Certains éléments laissent penser que cette relation possible de cause à effet ne peut pas être la seule responsable. Ainsi, l'expression des résultats par les pourcentages d'inhibition laisse apparaître une différence souvent plus importante que celle attendue entre le malade et le témoin, avec même dans certains cas des doses minimales agrégantes comparables entre les deux sujets. Ceci est conforté par l'étroite relation entre l'AMPc et la phospholipase; une action normale des prostaglandines inhibitrices sur l'AMPc entraînerait une activité phospholipasique semblable à celle du témoin. Ce dernier fait n'est pas en accord avec l'augmentation de la synthèse des prostaglandines à partir d'acide arachidonique endogène avec synthèse exogène normale.

L'hyperagrégabilité plaquettaire des diabétiques pourrait en partie relever d'un facteur plasmatique, ainsi que le montrent la susceptibilité de leurs plaquettes à l'arachidonate en plasma riche en plaquettes et sa correction en plaquettes isolées. D'autres travaux récents ont d'ailleurs établi chez les diabétiques que des protéines plasmatiques de faible poids moléculaire, seraient capable de majorer l'agrégation induite par l'ADP (37).

La complexité, la multitude, et l'intrication des mécanismes impliqués, rendent compte de la difficulté de leur interprétation. Une étude approfondie de l'effet de différentes substances telles que les prostaglandines ou les hormones sur l'AMPc plaquettaire, élucidera peut-être les processus en cause.

Le schéma 17 tente de réunir ces différentes hypothèses. Il ne figure pas le rôle éventuel de l'hormone de croissance.

L'existence probablement précoce des anomalies plaquettaires dans le diabète, autorise à penser que leur correction pourrait retarder l'apparition ou l'évolution des complications, d'autant plus que leur rôle dans la génèse des lésions vasculaires semble bien démontré ; Ainsi, des lapins rendus thrombocytopéniques par sérum antiplaquettaire, ne développent pratiquement pas de lésions après désendothélialisation par sonde à ballonnet (218).

L'emploi d'une insuline ultralente pourrait réduire les insulïnémies élevées trouvées chez le diabétique, en abaissant le pic maximal dû à l'utilisation d'insulines d'action plus courte. Cette précaution, accompagnée d'un régime normolipidique (< à 30% de lipides) et d'un fractionnement maximum des repas (5 à 6 par jour), serait peut-être susceptible de régulariser en partie la fonction

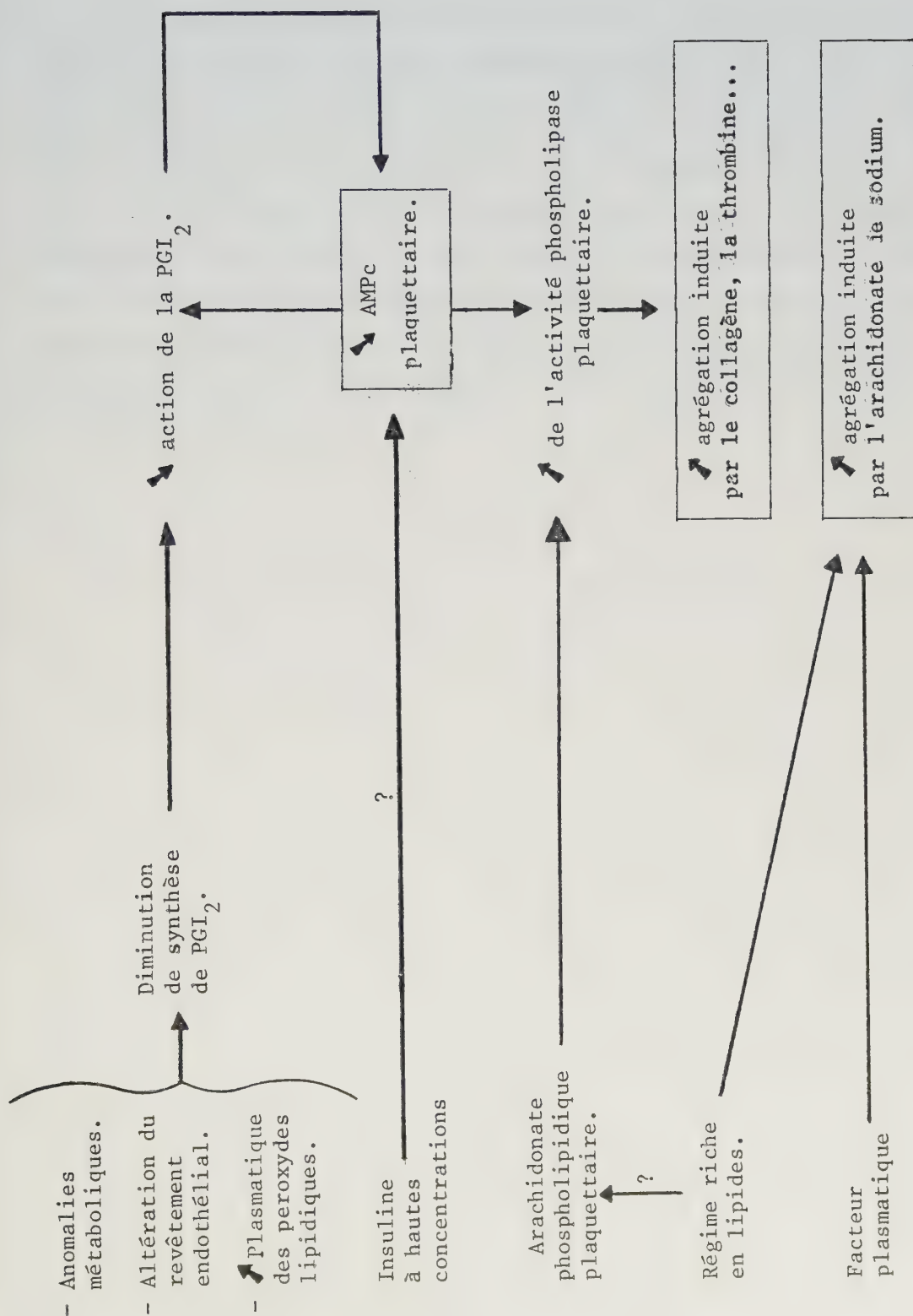


Schéma 17. DIFFÉRENTES HYPOTHESES DE L'HYPERACTIVITE PLAQUETTAIRE CHEZ LE DIABÉTIQUE.

↑ = Augmentation ; ↓ = Diminution

plaquettaire, par une approche plus correcte de la physiologie qui adapte et régle la sécrétion insulinique en fonction de l'apport calorique (notamment en glucose). Les microordinateurs ou les greffes n'étant pas encore au point ou de pratique courante, il faut ici adopter la ration calorique (et donc le glucose) à la dose d'insuline nécessaire.

En outre, les antiagrégants plaquettaires pourraient être une source appréciable dans la prévention des phénomènes thrombotiques dans le diabète à condition d'être utilisés à doses correctes. Moncada, a montré qu'il fallait de faibles doses d'acetyl salicylate pour ne pas entraver la synthèse de prostacycline, et que le dipyridamole potentialisait la PGI_2 endogène et favorisait la désagrégation (93, 155). Il semblerait que la meilleure association soit l'acetyl salicylate à 10 mg/Kg par jour ou tous les deux jours et le dipyridamole à 3 mg/Kg/jour. D'ailleurs, les diabétiques présentant une polyarthrite rhumatoïde seraient plus résistants à l'apparition de rétinopathie, peut-être en relation avec les antiinflammatoires non stéroïdiens qui constituent la base de leur traitement, hormis l'insuline (177).

CONCLUSIONS

Le diabète insulino-dépendant entraîne de nombreuses complications vasculaires déclenchées ou entretenues par des thromboses. Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans l'initiation des phénomènes thrombotiques.

Des connaissances récentes et précises, acquises sur le métabolisme des prostaglandines et de leurs dérivés, ont montré l'importance de ces produits dans l'agrégation plaquettaire. Un équilibre semble exister entre les effets agrégants des endoperoxydes (PGH_2 , PGG_2) et du thromboxane (TXA_2), et l'effet antiagrégant de la prostacycline (PGI_2).

Nous avons étudié l'agrégabilité des plaquettes de 30 sujets porteurs d'un diabète insulino-dépendant le plus souvent ancien (moyenne de 12,4 ans) et accompagné de complications évoluant à bas bruit, en la comparant par appariement à celle de témoins sains ayant le même sexe et environ le même âge.

Cette étude a porté sur la quantification, par méthode photométrique, des effets de différents inducteurs (collagène, arachidonate de sodium) et de différents inhibiteurs (PGI_2 , PGE_1 , PGD_2). Nous avons observé que les diabétiques

déclenchaient leur agrégation pour une dose d'inducteur inférieure à celle des sujets témoins. Il existe d'autre part une diminution de l'inhibition de l'agrégation des plaquettes diabétiques en présence des prostaglandines.

Par conséquent, nous confirmons les travaux antérieurs sur les doses minimales agrégantes, et nous apportons l'observation originale d'un état réfractaire des plaquettes diabétiques aux prostaglandines inhibitrices.

Les causes profondes pourraient être dues à une anomalie de stimulation des récepteurs des plaquettes diabétiques par les prostaglandines inhibitrices, ou à des perturbations dans la synthèse, le transport, ou le mécanisme d'action de l'AMPc.

On ne peut éliminer l'influence d'un facteur plasmatique, d'un facteur diététique ou de l'insuline. En effet, des expériences préliminaires, sur les plaquettes de sujets normaux, nous ont montré une compétition possible au niveau de la plaquette entre l'insuline et la PGI_2 .

Ces constatations peuvent apporter des arguments en faveur d'un meilleur contrôle diététique et hormonal du diabète. Elles ouvrent la voie à la recherche d'une action pharmacologique, et peuvent constituer un mode d'étude précis des différents agents prétendus efficaces dans la prévention des complications vasculaires du diabète.

Le Président de la Thèse,



Professeur R. MORNEX

Vu, le Doyen de la Faculté de
Médecine Alexis Carrel,

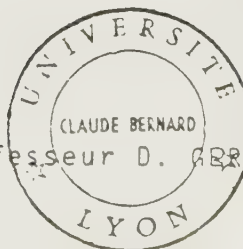


Professeur R. MORNEX

Vu et Permis d'Imprimer

LYON, le 10 JUIN 1980

Le Président de l'Université
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales,



Professeur D. GERMAIN

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- 1 - ABASTADO, M., DOUMENC, J., PROST, R., BORA, L., SAMAMA, M., DEROT, M., BOUSSER, J. Etude de l'activité fibrinolytique et des fonctions plaquet-taires dans le premier temps de l'hémostase chez les diabétiques. Presse. Med. 76, 1317, 1968.
- 2 - ABRAHAMSEN, A.F. Platelet survival studies in man (with special reference to thrombosis and atherosclerosis). N. Engl. J. Haemat. (suppl.3), 1, 1968.
- 3 - AMER, M.S., MAYOL, R.F. Studies with phosphodiesterase III. Two forms of the enzyme from human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta, 309, 149, 1973.
- 4 - ARDLIE, N.G., PACKHAM, M.A., MUSTARD, J.F. Adenosine diphosphate induced platelet aggregation in suspensions of washed rabbit platelets. Brit. J. Haemat. 19, 7, 1970.
- 5 - BABA, Y., KAI, M., SETOYAMA, S., OTSUJI, S. The lower levels of erythrocyte surface electric charge in diabetes mellitus. Clin. Chim. Acta, 84, 247, 1978.
- 6 - BANERJEE, R.N., SAHNI, A.L., KUMAR, V., ARYA, M. Antithrombin III deficiency in maturity onset diabetes mellitus and atherosclerosis. Thromb. Diath. Haemorrh. 31, 339, 1974.
- 7 - BAUMGARTNER, H.R., BORN, G.V.R. Effects of 5-hydroxy-tryptamine on platelet aggregation. Nature. 218, 137, 1968.
- 8 - BAUMGARTNER, H.R., MUGGLI, R., TSCHOPP, T.B., TURITTO, V.T. Platelet adhesion. Release and aggregation in flowing blood : effects of surface properties and platelet function. Thromb. Haemat. 35, 124, 1976.
- 9 - BEISSENGER, P.J., SPIRO, R.G. Human glomerular basement membrane : Chemical alteration in diabetes mellitus. Sciences. 168, 596, 1970.
- 10 - BENNETT, P.N. Effect of glucose on platelet adhesiveness. J. Atherosclerosis. Res. 7, 53, 1967.

- 11 - BENSOUSSAN, D., LEVY-TOLEDANO, S., PASSA, D., CAEN, J., CANIVET, J.
Platelet hyperaggregation and increased plasma level of Von Willebrand factor in diabetics with retinopathy. *Diabetologia*. 11, 307, 1975.
- 12 - BENSOUSSAN, D., PASSA, Ph., CANIVET, J., LEVY-TOLEDANO, S., CAEN, J.
L'agrégation plaquettaire et le dosage du facteur de Willebrand au cours du diabète sucré. *Nouv. Presse. Med.* 4, 195, 1975.
- 13 - BENSOUSSAN, D., LEVY-TOLEDANO, S., PASSA, Ph. Anomalies de l'hémostase primaire au cours de la microangiopathie diabétique. *Nouv. Presse. Med.* 36, 2383, 1976.
- 14 - BERN, M.N., BOSTON, M.D. Platelet function in diabetes mellitus. *Diabetes*. 27, 342, 1978.
- 15 - BEST, L., JONES, P.B.B., PRESTON, F.E. Effect of glucose on platelet thromboxane biosynthesis. *Lancet*. 2, 790, 1979.
- 16 - BILLS, T.K., SMITH, J.B., SILVER, M.J. Selective release of arachidonic acid from the phospholipids of human platelets in response to thrombin. *J. Clin. Invest.* 60, 1, 1977.
- 17 - BIZZI, B., LEONE, G., BONI, P. Basic considerations on treatment of increased platelet aggregation in diabetic vasculopathy patients. *Acta. Diabetol. Lat.* 11, 437, 1974.
- 18 - BORN, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reserval. *Nature*. 194, 927, 1962.
- 19 - BOUISSOU, H., PIERAGGI, M.T., JULIAN, M. Lésions anatomo-pathologiques des vaisseaux diabétiques. *Vie. Med.* 3, 101, 1975.
- 20 - BRIDGES, J.M., DALBY, A.M., MILLAR, J.H.D., WEAVER, J.A. An effect of D-glucose on platelet stickiness. *Lancet*. 1, 75, 1965.
- 21 - BROEKMAN, M.J., HANDIN, R.I., COHEN, P. Distribution of fibrinogen and platelet factors 4 and XIII in subcellular fractions of human platelets. *Brit. J. Haemat.* 31, 51, 1975.

- 22 - BRYANT, R.W., BAILEY, J.M. Isolation of a new lipoxigenase metabolite of arachidonic acid, 8, 11, 12 - hydroxy - 5, 9, 14, eicosatetraenoic acid from human platelets. Prostaglandins. 17, 9, 1979.
- 23 - BUNTING, S., GRYGLEWSKI, R., MONCADA, S., VANE, J.R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (PGX) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. Prostaglandins. 12, 897, 1976.
- 24 - BURROWS, A.W., CHAVIN, S.I., HOCKADAY, T.D.R. Plasma-thromboglobulin concentration in diabetes mellitus. Lancet. 1, 235, 1978.
- 25 - BUSCH, C., HELDEN, C.H., WASTESON, A., WESTERMARK, B. Stimulation of endothelial cell proliferation by a factor released from human platelets. Bibl. Anat. 16, 219, 1977.
- 26 - BUTCHER, R.W., HO, R.J., MENG, E.H., SUTHERLAND, E.W. Adenosine 3' 5' monophosphate in biological materials. J. Biol. Chem. 240, 4515, 1965.
- 27 - CAEN, J., CRONBERG, S., KUBISZ, P. Blood platelets "physiology and pathology" stratton intercontinental Medical book corp. New York, 1977.
- 28 - CAEN, J., LARRIEU, M.J., SAMAMA, M. L'hémostase. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique. L'expansion scientifique, p. 71.
- 29 - CAMPBELL, I.W., DAWES, J., FRASER, D.M., PEPPER, D.S., CLARKE, B.F., DUCAN, L.J.P., CASH, J.D. Plasma β -thromboglobulin in diabetes mellitus. Diabetes. 26, 1175, 1977.
- 30 - CHAKARIAN, A. Etude préliminaire de la déformabilité des globules rouges chez cent quarante six diabétiques. Thèse. Med. Paris, 1978.
- 31 - CHMIELEWSKI, J. Adhesiveness and aggregation of platelet in diabetic. Pol. Tyg. Lek. 25, 246, 1970.
- 32 - CHMIELEWSKI, J., FARBISZEWSKI, R. Platelet factor 4 (PF₄) release during human platelet aggregation in diabetic patients. Thromb. Diath. Haemorrh. 24, 205, 1970.

- 33 - CHO, M.J., ALLEN, M.A. Chemical stability of prostacyclin (PGI_2) in aqueous solutions. *Prostaglandins*. 15, 943, 1978.
- 34 - COHEN, P., DERKSON, A. Comparison of phospholipid and fatty acid composition of human erythrocytes and platelets. *Brit. J. Haemat.* 17, 359, 1967.
- 35 - COLWELL, J.A., SAGEL, J., PENNINGTON, M., LAIMINS, M. Effect of therapy on platelet aggregation in diabetes. *Clin. Res.* 21, 884, 1973.
- 36 - COLWELL, J.A., HALUSHKA, P.V., SARJI, K.E., and Al. Rationale for anti-platelet agents in diabetic vascular disease. In : DAY, H.J., MOLONY, B.A., NISHIZAWA, E.E. and Al (Eds) : *Thrombosis. Animal and Clinical models*. New York, Plenum. 243, 1978.
- 37 - COLWELL, J.A., NAIR, R.M.G., HALUSHKA, P.V., ROGERS, C., WHETSELL, A., SAGEL, J. Platelet adhesion and aggregation in diabetes mellitus. *Metabolism*. 28, 394, 1979.
- 38 - COOPER, B., SCHAFER, A.I., PUCHALSKY, D., HANDIN, R.I. Platelet resistance to prostaglandin D_2 in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 52, 618, 1978.
- 39 - COOPER, B. Agonist regulation of the human platelet prostaglandin D_2 receptor. *Life Sciences*. 25, 1361, 1979.
- 40 - COOPER, B., SCHAFER, A.I., PUCHALSKY, D., HANDIN, R.I. Desensitization of prostaglandin-activated platelet adenylate cyclase. *Prostaglandins*. 17, 561, 1979.
- 41 - COTTON, R.C., BLOOR, K., ARCHIBALD, G. Interrelationships between platelet response to adenosine diphosphate, blood coagulation and serum lipids in patients with peripheral occlusive atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 16, 337, 1972.
- 42 - CRAWFORD, N., TAYLOR, D.G. Biochemical aspects of platelet behaviour associated with surface membrane reactivity. *Brit. Med. Bull.* 33, 199, 1977.

- 43 - CRONBERG, S., CAEN, J. Platelet aggregation in washed suspensions. *Scand. J. Haemat.* 8, 161, 1971.
- 44 - CZERVIONKE, R.L., SMITH, J.B., HOAK, J.C., FRY, G.L. Use of a radioimmunoassay to study thrombin induced release of PGI₂ from cultured endothelium. *Thromb. Res.* 14, 781, 1979.
- 45 - DAVIS, T.M.E., MITCHELL, M.D., TURNER, R.C. Prostacyclin and thromboxane metabolites in diabetes. *Lancet.* 2, 789, 1979.
- 46 - DAWES, J., SMITH, R.C., PEPPER, D.S. The release, distribution and clearance of human β -thromboglobulin and platelet factor 4. *Thrombos. Res.* 12, 851, 1978.
- 47 - DAY, J.F., THORNBURG, R.W., THORPE, S.R., BAYNES, J.W. Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 254, 9394, 1979.
- 48 - DECHAVANNE, M., LAGARDE, M. Effets de la chloroquine sur les activités adénylate cyclasique et phosphodiesterasique de plaquettes humaines. *Experientia.* 30, 34, 1974.
- 49 - DIEBOLD, J., CAMILLERI, J.P. Micro et macroangiopathies diabétiques. Aspects anatomo-pathologiques. *Rev. Prat.* 26, 3075, 1976.
- 50 - DITZEL, J., STANDL, E. The problem of tissue oxygenation in diabetes mellitus. I. Its relation to the early functional changes in the microcirculation of diabetic subjects. *Acta. Med. Scand. Suppl.* 578, 49, 1975.
- 51 - DOBBIE, J.G., KWAAN, H.C., COLWELL, J.A., SUWANWELA, N. Role of platelets in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Arch. Ophtalmol.* 91, 107, 1974.
- 52 - DOLHOFFER, R., WIELAND, O.H. Glycosylation of serum albumin : elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *Febs. Lett.* 103, 282, 1979.
- 53 - DOLLERY, C.T., FRIEDMAN, L.A., HENSBY, C.N., KOHNER, E. Circulating prostacyclin may be reduced in diabetes. *Lancet.* 2, 1365, 1979.

- 54 - DUMONDE, D.C., JOSE, P.J., PAGE, D.A., WILLIAMS, T.J. Production of prostaglandins by porcine endothelial cells in culture. *Br. J. Pharmacol.* 61, 504, 1977.
- 55 - DYEBERG, J., BANG, H.O., STOFFERSEN, E., MONCADA, S., VANE, J.R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* 2, 117, 1978.
- 56 - ESKIN, S.G., SYBERS, H.D., REVINO, L. Thromboresistant surfaces of tissue cultured cells. In : BECKER, R.P., JOHARI, O. (Eds) : Scanning electron microscopy. SEM Inc. AMF O'HARE, III, 2, 747, 1978.
- 57 - ESNOUF, M.P. Biochemistry of blood coagulation. *Brit. Med. Bull.* 33, 213, 1977.
- 58 - FALARDEAU, P., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B. Metabolism of 8, 11, 14 eicosatrienoic acid in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta.* 441, 193, 1976.
- 59 - FERGUSON, J.C., MACKAY, N., PHILIP, J.A.D. Platelet and fibrinogen kinetic studies in diabetes mellitus. *Br. J. Haematol.* 25, 545, 1973.
- 60 - FERGUSON, J.C., MACKAY, N., PHILIP, J.A.D., SUMMER, D.J. Determination of platelet and fibrinogen half-life with (⁷⁵Se) selenomethionine : studies in normal and in diabetic subjects. *Clin. Sci. Molec. Med.* 49, 115, 1975.
- 61 - FLEISCHMAN, A.I., BIERENBAUM, M.L., STIER, A., SOMOL, H., WATSON, P.B. In vivo platelet function in diabetes mellitus. *Thromb. Res.* 9, 467, 1976.
- 62 - FOLLEA, G. Antithrombine III et diabète sucré. Thèse. Med. Montpellier, 1976.
- 63 - FRENCH, J.E. Blood platelets : morphological studies on their properties and life cycle. *Brit. J. Haemat.* 13, 595, 1967.
- 64 - FULLER, J.H., KEEN, H., JARRETT, R.J. Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Brit. J. Med.* 2, 964, 1979.

- 65 - GABBAY, K.H. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. N. Engl. J. Med. 288, 831, 1973.
- 66 - GANDOLFO, G.M., DE ANGELIS, A., TORRESI, M.V. Determination of antithrombin III activities by different methods in diabetic patients. J. Haemost. 9, 15, 1980.
- 67 - GARG, S.K., LECKNER, H., KARPATKIN, S. The increased percentage of megathrombocytes in various clinical disorders. Ann. Int. Med. 77, 361, 1972.
- 68 - GERRARD, J.M., WHITE, J.G., RAO, G.H.R., TOWNSEND, D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. AM. J. Pathol. 83, 283, 1976.
- 69 - GERRARD, J.M., WHITE, J.G., PETERSON, D.A. The platelet dense tubular system : its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. Thrombos. Haemostas. 40, 224, 1978.
- 70 - GIBOFSKY, A., JAFFE, E.A., FOTENO, M., BECKER, C.G. The identification of HLA antigens on fresh and cultures human endothelial cells. J. Immunol. 115, 730, 1975.
- 71 - GIMBIONE, M.A. Jr., COTRAN, R.S., FOLKMAN, J. Endothelial regeneration : studies with human endothelial cells in culture. Ser. Haematol. 6, 453, 1973.
- 72 - GLIMELIUS, B., BUSCH, C., HOOK, M. Binding of heparin on the surface of cultured human endothelial cells. Thromb. Res. 12, 773, 1978.
- 73 - GORMAN, R.R., BUNTING, S., MILLER, O.V. Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostaglandin (PGX). Prostaglandins. 13, 377, 1977.
- 74 - GRYGLEWSKI, R.J., BUNTING, S., MONCADA, S., FLOWER, R.J., VANE, J.R. Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. Prostaglandins. 12, 685, 1976.

- 75 - GUCCIONE, M.A., PACKHAM, M.A., KINDLOUGH-RATHBONE, R.L., MUSTARD, J.F.
Reactions of ^{14}C -ADP and ^{14}C -ATP with washed platelets from rabbits. *Blood*. 37, 542, 1971.
- 76 - HAJJAR, G.C., MOSER, K. Variations in plasma fibrinogen and euglobulin activity in normal diabetic and cirrhotic subjects. *Clin. Res.* 9, 160, 1961.
- 77 - HALUSHKA, P.V., LURIE, D., COLWELL, J.A. Increased synthesis of prostaglandin "E-like" material by platelets from patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 297, 1306, 1977.
- 78 - HAMBERG, M., SAMUELSSON, B. Prostaglandin endoperoxides : novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 3400, 1974.
- 79 - HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 3824, 1974.
- 80 - HAMBERG, M., SVENSSON, J., WAKABAYASHI, T., SAMUELSSON, B. Isolation and structure of two prostaglandins endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 345, 1974.
- 81 - HAMBERG, M., SVENSSON, J., SAMUELSSON, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 2994, 1975.
- 82 - HAMMARSTROM, S., FALARDEAU, P. Resolution of prostaglandin endoperoxide synthetase and thromboxane synthetase of human platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 3691, 1977.
- 83 - HASLAM, R.J., DAVIDSON, M.M.L., FOX, J.E.B., LYN HAM, J.A. Cyclic nucleotides in platelet function. *Thrombos. Haemostas.* 40, 232, 1978.
- 84 - HASSANEIN, A.A., EL-GARF, Th.A., EL-BAZ, Z. Platelet aggregation in diabetes mellitus and the effect of insulin in vivo on aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 27, 114, 1972.

- 85 - HATHORN, M., GILLYMAN, T. Blood lipids mucoproteins and fibrinolytic activity in diabetic indians and africans in natal. *Lancet.* 1, 1314, 1961.
- 86 - HAUTECOUVERTURE, M., BASDEVANT, A., SLAMA, G., TCHOBROUTSKY, G. Etio-pathogénie, physiopathologie et épidémiologie de la micro-angiopathie diabétique. *Rev. Prat.* 26, 3085, 1976.
- 87 - HEATH, H., BRIDGEN, W.D., GENEVER, J.V., POLLOCK, J., HUNTER, P.R., KESLEY, J., BLOOM, A. Platelet adhesiveness and aggregation in relation to diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 7, 308, 1971.
- 88 - HEDLIN, A.M. Insulin and blood fibrinolytic activity. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 29, 293, 1973.
- 89 - HIEBERT, L.M., JAKES, L.B. The observations of heparin in endothelium after injection. *Thromb. Res.* 8, 195, 1976.
- 90 - HIGGS, E.A., MONCADA, S., VANE, J.R., CAEN, J., MICHEL, H., TOBELEM, G. Effect of prostacyclin (PGI_2) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins.* 16, 17, 1978.
- 91 - HO, P.P.K., WALTERS, C.P., SULLIVAN, H.R. A particulate arachidonate lipoxygenase in human blood platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 398, 1977.
- 92 - HOLMSEN, H., STEKOWSKY, C.A., LAGES, B., DAY, H.T., WEISS, H.J., SCRUTTON, M.C. Content and thrombin induced release of acid hydrolases in gel filtered platelets from patients with storage pool disease. *Blood.* 46, 131, 1975.
- 93 - HONOUR, A.J., HOCKADAY, T.D., MANN, J.I. The synergistic effect of aspirin and dipyridamole upon platelet thrombi in living blood vessels. *British. J. Exp. Pathol.* 58, 268, 1977.
- 94 - HORLINGTON, M., WATSON, P.A. Inhibition of 3', 5'-cyclic AMP phosphodiesterase by some platelet aggregation inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 19, 955, 1970.

- 95 - HORNS, D.J., GERRARD, J.M., RAO, G.H., KRIVIT, W., WHITE, J.G. Smoking and platelet labile aggregation stimulating substance (LASS) synthesizing activity. *Thromb. Res.* 9, 661, 1976.
- 96 - HORNSTRA, G., LEWIS, B., GHART, A., TURPINEN, O., KARVONEN, M.J., VERGROESEN, A.J. Influence of dietary fat on platelet in man. *Lancet.* 1, 1155, 1973.
- 97 - HOVIG, T. Release of a platelet aggregating substance (adenosine diphosphate) from rabbit blood platelets induced by saline "extract" of tendons. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* 9, 264, 1963.
- 98 - HOWARD, M.A., FIRKIN, B.G. Ristocetin. A new tool in the investigation of platelet aggregation. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 26, 362, 1971.
- 99 - HOYER, L.W., DE LOS SANTOS, R.P., HOYER, J.R. Antihemophilic factor antigen : localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy. *J. Clin. Invest.* 52, 2737, 1973.
- 100 - HUGUES, J., LAPIERRE, C.M. Nouvelle recherche sur l'accolement aux fibres de collagène. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* 11, 327, 1964.
- 101 - HUTTON, R.A., MIKHAILIDIS, D., DORMANDY, K.M., GINSBURG, J. Platelet aggregation studies during transient hypoglycaemia. *J. Clin. Pathol.* 32, 434, 1979.
- 102 - IRELAND, J.T., PATNAIK, B.K., DUNCAN, L.J.P. Glomerular ultrastructure in secondary diabetic and normal subjects. *Diabetes.* 16, 628, 1967.
- 103 - JAFFE, E.A., HOYER, L.W., NACHMAN, R.L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 52, 2757, 1973.
- 104 - JAFFE, E.A., NACHMAN, R.L., BECKER, C.G., MINICK, C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52, 2745, 1973.

- 105 - JAFFE, E.A., HOYER, L.W., NACHMAN, R.L. Synthesis of Von Willebrand factor by cultured human cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 1906, 1974.
- 106 - JAQUES, L.B., MAHADOO, J. Pharmacodynamics and clinical effectiveness of heparin. *Semin. Thromb. Hemost.* 4, 298, 1978.
- 107 - JARETT, L. Pathophysiology of the insulin receptor. *Human Pathol.* 10, 301, 1979.
- 108 - JOHNSON, S.A. Endothelial supporting function of platelets. In : JOHNSON, S.A. (Ed) : The circulating platelet. Acad. Press. New York. 284, 1971.
- 109 - JOHNSON, S.A., MORTON, D.R., KINNER, J.H., GORMAN, R.R., GUIRE, J.C., SUN, F.F. The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins.* 12, 915, 1976.
- 110 - JONES, R.L., PETERSON, C.M. Reduced fibrinogen survival in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 63, 485, 1979.
- 111 - JOYNES, W.L., STRAND, J.C. Differential release of prostaglandin E-Like and F-like substances by endothelial cells cultured from human umbilical arteries and veins. *Microvas. Res.* 16, 119, 1978.
- 112 - KÄSER-GLANZMANN, R., JAKIBOUN, M., GEORGE, J.N., LÜSCHER, E.F. Stimulation of calcium uptake in platelet membrane vesicles by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 466, 429, 1977.
- 113 - KERN, P., MOCZAR, M., ROBERT, L., REGNAULT, F. Alterations of collagen types in normal and diabetic mice skins. Colloque I.N.S.E.R.M. : Aspects cellulaires et biochimiques dans la rétinopathie diabétique. Paris. 2 et 3 février 1978.
- 114 - KINLOUGH-RATHBONE, R.L., CHALIL, A., PACKAM, M.A., REIMERS, H.J., MUSTARD, J.F. Effect of ionophore A 23187 on thrombin-degranulated washed rabbit platelets. *Thromb. Res.* 7, 435, 1975.
- 115 - KITCHENS, C.S., WEISS, L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood.* 46, 567, 1975.

- 116 - KWAAN, M.C., COLWELL, J.A., CRUZ, S., SUWANWELA, N., DOBBIE, J.G. Increased platelet aggregation in diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* 80, 236, 1972.
- 117 - KWAAN, H.C., COLWELL, J.A., SUWANWELA, N. Disseminated intravascular coagulation in diabetes mellitus, with reference to the role of increased platelet aggregation. *Diabetes.* 21, 108, 1972.
- 118 - LAGARDE, M., DECHAVANNE, M., THOUVEREZ, J.P., VERRY, M. Effects of gliclazide, a new antidiabetic agent, on the platelet release reaction, role of adenylate cyclase. *Thromb. Res.* 6, 345, 1975.
- 119 - LAGARDE, M., DECHAVANNE, M. Thrombin decreases platelet cyclic AMP in the absence of prostaglandin synthesis. *Biomed.* 27, 110, 1977.
- 120 - LAGARDE, M., BRYON, P.A., GUICHARDANT, M., DECHAVANNE, M. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb. Res.* 17, 581, 1980.
- 121 - LAGARDE, M., BERCIAUD, P., BURTIN, M., SOULIER, M., VELARDO, B., DECHAVANNE, M. Platelet prostaglandins and related compounds in diabetes mellitus. (soumis à publication).
- 122 - LAGARDE, M., VELARDO, B., BLANC, M., DECHAVANNE, M. Fatty acids bound to serumalbumin decrease the half-life of thromboxane A₂. (soumis à publication).
- 123 - LAGES, B. Studies on gel filtered human platelets : isolation and characterization in a medium containing no added Ca⁺⁺, Mg⁺, or K⁺. *J. Lab. Clin. Med.* 85, 811, 1975.
- 124 - LAPETINA, E.G., SCHMITGES, C.J., CHANDRABOSE, K., CUATRECASAS, P. Cyclic AMP and prostacyclin inhibit platelet membrane phospholipase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 828, 1977.
- 125 - LAPETINA, E.G., CHANDRABOSE, K., CUATRECASAS, P. Ionophore A 23187-and thrombin-induced platelet aggregation : independance from cyclooxygenase products. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 75, 818, 1978.

- 126 - LARCAN, A., STREIFF, F., HURIET, C.P., ALEXANDRE, P. Etude concernant l'équilibre fibrinolytique au cours du diabète. *Nouv. Presse. Med.* 72, 2803, 1964.
- 127 - LEGRAND, Y., FAUVEL, F. Platelet adhesion to type I and III collagens : involment of alpha I (I) CB₆ and alpha I (III) CB₄ peptids. Colloque I.N.S.E.R.M. : Aspects cellulaires et biochimiques dans la rétinopathie diabétique. Paris. 2 et 3 février 1978.
- 128 - LEVY-TOLEDANO, S., DMOSZYNSKA, A., DUPUY, E., GAUDEUIL, P., LUBETZKI, J., CAEN, J. Platelet coagulant activities and clotting factors associated with platelets in diabetic patient. Colloque I.N.S.E.R.M. : Aspects cellulaires et biochimiques dans la rétinopathie diabétique. Paris. 2 et 3 février 1978.
- 129 - LOCKE, S. Nervous system and diabetes. In : MARBLE, A., WHITE, J.G., BRADLEY, R.F., and KRALL, L.P. (Eds). *JOSLIN'S Diabetes Mellitus*. Philadelphia Lea and Febiger, 562, 1971.
- 130 - LÜSCHER, E.F., BETTEX-GALLAND, M. Thrombosthenin, the contractile protein of blood platelets. *New Facts and problems. Path. Biol.* 20 (suppl), 89, 1972.
- 131 - MACA, R.D., FRY, G.L., HOAK, J.C., LOH, P.T. The effects of intact platelets, on cultured human endothelial cells. *Thromb. Res.* 11, 715, 1977.
- 132 - MACA, R.D., FRY, G.L., HOAK, J.C. The effects of glucocorticoides on cultured human endothelial cells. *Br. J. Haematol.* 38, 501, 1978.
- 133 - McDONALD, R.I., SHEPRO, D., ROSENTHAL, M., BOOYSE, F.M. Properties of cultured endothelial cells. *Ser. Haematol.* 6, 469, 1973.
- 134 - McINTYRE, D.E., PEARSON, J.D., GORDON, J.L. Localization and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature.* 271, 549, 1978.
- 135 - McMILLAN, D.E. Disturbance of serum viscosity in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 53, 1071, 1974.

- 136 - McMILLAN, D.E. Deterioration of the microcirculation in diabetes. *Diabetes*. 24, 944, 1975.
- 137 - MALCZAK, H.T., BUCK, R.C. Regeneration in rat aorta after local freezing. *Am. J. Pathol.* 86, 133, 1977.
- 138 - MALMSTEN, C., GRANSTROM, E., SAMUELSSON, B. Cyclic AMP inhibits synthesis of an endoperoxide (PGG₂) in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 569, 1976.
- 139 - MARCUS, A.J., ULLMAN, H.L., SAFIER, L.B. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelet. *J. Lipid. Res.* 10, 108, 1969.
- 140 - MARCUS, A.J., WEKSLER, B.B., JAFFE, E.A. Enzymatic conversion of prostaglandins endoperoxide H₂ and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 253, 7138, 1978.
- 141 - MARION, I., BARNHART, Ph. D., CHARLES, A., BAECHLER, Ph. D. Endothelial cell physiology, perturbations and responses. *Sem. Thromb. Haemost.* 5, 2, 1978.
- 142 - MASSINI, P., KASER-GLANZMANN, R., LUSCHER, E.F. Movement of calcium ions and their role in the activation of platelets. *Thromb. Haemost.* 40, 212, 1978.
- 143 - MAYNE, E.E., BRIDGES, J.M., WAEVER, J.A. Platelet adhesiveness, plasma fibrinogen and factor VIII levels in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 6, 436, 1970.
- 144 - MILLS, D.C.B., ROBERTS, G.C.K. Effects of adrenaline on human blood platelets. *J. Physiol.* 193, 443, 1967.
- 145 - MILLS, D.C.B., McFARLANE, D.E. Stimulation of human platelet adenyl cyclase by prostaglandin D₂. *Thromb. Res.* 5, 401, 1974.
- 146 - MILLS, D.C.B., McFARLANE, D.E. Prostaglandins and platelet adenylate cyclase In : SILVER, M., SMITH, J.B., KOC SIS, J.J. (Eds) : Prostaglandins in haematology. Spectrum Publications. New York. 219, 1977.

- 147 - MILLS, D.C.B., McFARLANE, D.E., NICOLAOU, K.C. Interaction of prostacyclin (PGI_2) with the prostaglandin receptors on human platelets that regulate adenylate cyclase activity. *Blood*. 50 (suppl 1), 247, 1977.
- 148 - MINKES, M., STANFORD, N., CHY, M.Y., ROTH, G.J., REZ, A., NEEDLMAN, P., MAJERUS, P.W. Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate inhibits the availability of arachidonate to prostaglandin synthetase in human platelet suspensions. *J. Clin. Invest.* 59, 449, 1977.
- 149 - MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S., VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 263, 663, 1976.
- 150 - MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S., VANE, J.R. A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. *Prostaglandins*. 12, 715, 1976.
- 151 - MONCADA, S., BUNTING, S., MULLANE, K. Imidazole : a selective inhibitor of thromboxane synthetase. *Prostaglandins*. 13, 611, 1977.
- 152 - MONCADA, S., HERMAN, A.G., HIGGS, E.A., VANE, J.R. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI_2) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.* 11, 323, 1977.
- 153 - MONCADA, S., HIGGS, E.A., VANE, J.R. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (Prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*. 1, 18, 1977.
- 154 - MONCADA, S., VANE, J.R. The discovery of prostacyclin (PGX) ; a fresh insight into arachidonic acid metabolism. In : KHARASCH, N. (Ed). *Biochemical aspects of Prostaglandins and thromboxanes*. Academic Press. New York. 155, 1977.
- 155 - MONCADA, S., KORBUT, R. Dipyridamole and other phosphodiesterase inhibitors act as antithrombotic agents by potentiating endogenous prostacyclin. *Lancet*. 1, 1286, 1978.

- 156 - MONCADA, S., VANE, J.R. Unstable metabolites of arachidonic and their role in haemostasis and thrombosis. *Br. Med. Bull.* 34, 129, 1978.
- 157 - MONCADA, S., VANE, J.R. The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed. Proc.* 38, 66, 1979.
- 158 - MOORE, S., PEPPER, D.S., CASH, J.D. The isolation and characterization of a platelet-specific β -globulin (β -thromboglobulin) and the detection of anti urokinase and antiplasmin released from thrombin-aggregated washed human platelet. *Biochim. Biophys. Acta.* 379, 360, 1975.
- 159 - MUSTARD, J.F., JORGENSEN, L., HOVIG, V., GLYNN, M.F., ROSWELL, H.C. Role of platelets in thrombosis. In : SCHATTAVEN, F.K. (Ed) : Pathogenesis and treatment of thromboembolic diseases. Verlag. Stuttgart, 131, 1966.
- 160 - MUSTARD, J.F., PERRY, D.W., ARDLIE, M.G., PACKAM, M.A. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Brit. J. Haemat.* 22, 193, 1972.
- 161 - MUSTARD, J.F., PACKAM, M.A. Platelet and diabetes mellitus. *New. Engl. J. Med.* 297, 1345, 1977.
- 162 - NEEDLEMAN, P., MINKES, M., RAZ, A. Thromboxanes. Selective biosynthesis and distinct biological properties. *Science.* 193, 163, 1976.
- 163 - NEEDLEMAN, P., BRONSON, S.D., WYCHE, A., SIVAKOFF, M., NICOLAOU, K.C. Cardiac and renal prostaglandin I_2 . Biosynthesis and biological effects in isolated perfused rabbit tissues. *J. Clin. Invest.* 61, 839, 1978.
- 164 - NORDOY, A., RODSET, J.M. Platelet phospholipids and their function in patients with juvenile diabetes and maturity onset diabetes. *Diabetes.* 19, 698, 1970.
- 165 - NORDOY, A., SVENSSON, B., HOAK, J.C. The inhibitory effect of albumin endothelial cell monolayers on platelet reactions and its inhibition by aspirin. *Thromb. Res.* 12, 597, 1978.
- 166 - NORDOY, A., SVENSSON, B., HOAK, J.C. The effects of albumin bound fatty acids on platelet inhibitory function of human endothelial cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 9, 5, 1979.

- 167 - ODEGAARD, A.E., SKALHEGG, B.A., HELLEM, A.J. Increased activity of "anti Willebrand factor" in diabetic plasmas. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* 11, 27, 1964.
- 168 - O'GRADY, J., MONCADA, S. Aspirin : a paradoxal effect on bleeding time. *Lancet.* 2, 780, 1978.
- 169 - O'MALLEY, B.C., TIMPERLEY, W.R., WARD, J.D., PORTER, N.R., PRESTON, F.E. Platelet abnormalities in diabetic peripheral neuropathy. *Lancet.* 2, 1274, 1975.
- 170 - OWREN, P.A. Coronary thrombosis : Its mecanism and possible prevention by linoleic acid. *Ann. Intern. Med.* 63, 167, 1965.
- 171 - PACE-ASCIAK, C. Isolation, structure and biosynthesis of 6-Keto-prostaglandin $Fl\alpha$ in the rat stomach. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 2348, 1976.
- 172 - PACKAM, M.A., KINLOUGH-RATHBONE, R.L., REIMERS, M.J., SCOTT, S., MUSTARD, J.F. Mechanisms of platelet aggregation independant of adenosine diphosphate In : SILVER, M.J., SMITH, J.B., KOCSIS, J.J. (Eds) : Prostaglandins in hematology. Spectrum publications. New York. 3, 247, 1977.
- 173 - PASSA, P., BENSOUSSAN, D., CANIVET, J., LEVY-TOLEDANO, S., CAEN, J. Correction après hypophysectomie de l'hyperagrégation plaquettaire observée au cours de la rétinopathie diabétique. *Presse. Med.* 2, 2057, 1973.
- 174 - PASSA, P., BENSOUSSAN, D., LEVY-TOLEDANO, S., CAEN, J., CANIVET, J. Etude de l'agrégation plaquettaire au cours de la rétinopathie diabétique. Influence de l'hypophysectomie. *Atherosclerosis.* 19, 277, 1974.
- 175 - PFUELLER, S.L., LUSCHER, E.F. The effects of immune complexes on blood platelets and their relationship to complement activation. *Immunochem.* 9, 1151, 1972.
- 176 - PIRART, J. Diabetic neuropathy a metabolic or a vascular disease ? *Diabetes.* 14, 1, 1965.
- 177 - POWEL, E.D., FIELD, R.A. Diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2, 17, 1964.

- 178 - PRESTON, F.E., WARD, J.D., MARCOLA, B.H., PORTER, N.R., TIMPERLEY, W.R., O'MALLEY, B.C. Elevated β -thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathy. *Lancet.* 1, 238, 1978.
- 179 - PROST-DVOJAKOVIC, R.J., SAMAMA, M. Clot-promoting and platelet-aggregating effects on fatty acids. *Haem.* 2, 73, 1974.
- 180 - PROST-DVOJAKOVIC, R.J., LECRUSIER, CH., LANOE, R., BATCHVAROVA, V., SAMAMA, M. Etude de l'agrégation plaquettaire et du facteur Willebrand chez 32 diabétiques insulino-dépendants. Intérêt de la mesure de la pression de filtration en présence d'ADP. *Journées de diabétologie.* 239, 1976.
- 181 - RATJAR, G., DE GAETANO, G. Tranylcypromine is not a selective inhibitor of prostacyclin in rats. *Thromb. Res.* 14, 245, 1979.
- 182 - REGNAULT, F., KERN, P. Modification de l'agrégation plaquettaire chez les diabétiques atteints de rétinopathie. *C.R. Soc. Biol.* 165, 769, 1971.
- 183 - REGNAULT, F. Rôle des plaquettes dans la pathogénie de la rétinopathie diabétique. *Sem. Hop. Paris.* 48, 893, 1972.
- 184 - REGNAULT, F., ROMQUIN, N. Platelets-endothelial cells interaction. Colloque I.N.S.E.R.M. : Aspects cellulaires et biochimiques dans la rétinopathie diabétique. Paris. 2 et 3 février 1978.
- 185 - REIMESS, H.J., KINLOUGH-RATHBONE, R.L., CAZENAVE, J.P., SENYI, A.F., HIRSCH, J., PACKAM, M.A., MUSTARD, J.F. In vitro and in vivo functions of thrombin-treated platelets. *Thrombos.Haemost.* 35, 151, 1976.
- 186 - REMUZZI, G., MARCHESI, D., LIVIO, M., CAVENAGHI, A.E., MECCA, G., DONATI, M.B., DE GAETANO, G. Altered platelet and vascular prostaglandin generation in patients with renal failure and prolonged bleeding times. *Thromb. Res.* 13, 1007, 1978.
- 187 - ROBERT, L., LAGRUE, G., MISKULIN, M., ROBERT, A.M. Correlation between micro-angiopathy and deranged matrix macromolecules biosynthesis. Colloque I.N.S.E.R.M. : Aspects cellulaires et biochimiques dans la rétinopathie diabétique. Paris. 2 et 3 février 1978.

- 188 - ROSS, R., GLOMSET, J., KARIYA, B., HARKER, L.A. A platelet dependant serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 1207, 1974.
- 189 - RUCINSKY, B., NIEWIAROWSKI, S., JAMES, P., WALZ, D.A., BUDZYNSKI, A.Z. Antiheparin proteins secreted by human platelets. Purification, characterization and radioimmunoassay. *Blood.* 53, 47, 1979.
- 190 - SAGEL, J., COLWELL, J.A., CROOK, L., LAIMINS, M. Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 82, 733, 1975.
- 191 - SALZMAN, E.W. Measurement of platelet adhesiveness. *Proc. Ninth. Congr. Internat. Soc. Hemat. Mexico City.* September, 1962.
- 192 - SALZMAN, E.W., EENSLER, P.C., LEVINE, L. cAMP in human blood platelets. In : *Regulatory role in platelet function.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 201, 61, 1972.
- 193 - SALZMAN, E.W., WEISEGERGER, H. Role of cyclic AMP in platelet function. In : *GREENGARD, P., ROBINSON, G.A. (Eds) : Advances in cyclic nucleotide Research.* Raven Press. New York. 1, 231, 1972.
- 194 - SAMUELSSON, B., HAMBERG, M., HALMSTEN, C., SVENSSON, J. The role of prostaglandin endoperoxides and thromboxanes in platelet aggregation. In : *SAMUELSSON, B., PAOLETTI, R. (Eds) : Advances in prostaglandin and thromboxane Research.* Raven Press. New York. 2, 737, 1976.
- 195 - SAMUELSSON, B. The role of prostaglandin endoperoxides and thromboxanes in human platelets. In : *SILVER, M.J., SMITH, J.B., KOCSIS, J.J. (Eds) : Prostaglandins in hematology.* Spectrum Publications. New York. 1, 1977.
- 196 - SARJI, K.E., KLEINFEDER, J., BREWINGTON, P., GONZALES, J., HEMPLING, H., COLWELL, J.A. Decreased platelet Vit C in diabetes mellitus. Possible role in hyperaggregation. *Thromb. Res.* 15, 639, 1979.
- 197 - SATO, Y., HOTTA, N., SAKAMOTO, N., MATSUOKA, S., OHISHI, N., YAGI, K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem. Med.* 21, 104, 1979.

- 198 - SCHAFER, A.I., COOPER, B., O'HARA, D., HANDIN, R.I. Identification of platelet receptors for prostaglandin I_2 et D_2 . J. Biol. Chem. 254, 2914, 1979.
- 199 - SIEGL, A.M., SMITH, J.B., SILVER, M.J., NICOLAOU, K.C., BURNETTO, W.E. Binding of prostacyclin by platelets. Fed. Proc. 37, 254, 1978.
- 200 - SIEGL, A.M. SMITH, J.B., SILVER, M.J. Selective binding site for (3H) prostacyclin on platelets. J. Clin. Invest. 63, 215, 1979.
- 201 - SIM, A.K., McCRAW, A.P. The activity of γ -linoleate and dihomog γ -linoleate methyl esters in vitro and in vivo on blood platelet function in non-human primates and in man. Thromb. Res. 10, 385, 1977.
- 202 - SMALL, P., MACARAK, E., FISHER, A.B. Production of 5-hydroxyindoleacetic acid from serotonin by cultured endothelial cells. J. Cell. Physiol. 90, 225, 1977.
- 203 - SMITH, J.B., INGERMAN, C.M., SILVER, M.J. Formation and release of prostaglandins in response to thrombin. Brit. J. Pharmacol. 40, 545, 1970.
- 204 - SMITH, J.B., WILLIS, A.L. Aspirin selectivity inhibits prostaglandin production in human platelets. Nature. New Biol. 231, 235, 1971.
- 205 - SMITH, J.B., SILVER, M.J., INGERMAN, C.M., KOCSIS, J.J. Prostaglandin D_2 Inhibits the aggregation of human platelets. Thromb. Res. 5, 291, 1974.
- 206 - SOLER-ARGILAGA, C., INFANTE, R., POLONOSKI, J. Demonstration of two pools of albumin bound fatty acids. J. Lipid. Res. 16, 116, 1975.
- 207 - SONG, S.Y., CHEUNG, W.Y. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase properties of the enzyme of human blood platelets. Biochim. Biophys. Acta. 242, 593, 1971.
- 208 - SPECTOR, A.A., KATHRYN, J., FLETCHER, J.E. Binding of long chain fatty acids to bovine serum albumin. J. Lipid. Res. 10, 56, 1969.
- 209 - SPECTOR, A.A. Fatty acid binding to plasma albumin. J. Lipid. Res. 16, 165, 1975.

- 210 - SPIRO, R.G. Biochemistry of the glomerular basement membrane in diabetes. In : CAMERINI-DAVALOS, R.A., COLE, H.S. (Eds) : Vascular and neurological changes in Early diabetes. Academic Press. New York. 179, 1973.
- 211 - STUART, M.J., ELRAD, H., GRAEBER, J.E., HAKANSON, D.O., SUNDERJI, S.G., BARVICHAK, M.K. Increased synthesis of prostaglandin endoperoxides and platelet hyperfunction in infants of mothers with diabetes mellitus. J. Lab. Clin. Med. 94, 12, 1979.
- 212 - SZCZEKLIK, A., SKAVRINSKI, S., GLUSZKO, P., NOZANKOWSKI, R. Successful therapy of advanced atherosclerosis obliterans with prostacyclin. Lancet. 1, 1111, 1979.
- 213 - TATESON, J.E., MONCADA, S., VANE, J.R. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. Prostaglandins. 13, 389, 1977.
- 214 - THORGISSON, G., ROBERTSON, A.L. The vascular endothelium. Pathologic significance. Amer. J. Pathol. 93, 803, 1978.
- 215 - THORGISSON, G., ROBERTSON, A.L. Platelet factors and the human vascular wall variations in growth response between endothelial and medial smooth muscle cells. Atherosclerosis. 30, 67, 1978.
- 216 - TIMPERLEY, W.R., WARD, J.D., PRESTON, F.E. Clinical and histological studies in diabetic neuropathy : a reassessment of vascular factors in relation to intravascular coagulation. Diabetologia. 12, 237, 1976.
- 217 - TOBELEM, G., LEVY-TOLEDANO, S., BREDOUX, R., MICHEL, H., NURDEN, A., CAEN, J. New approach to determination of specific functions of platelet membrane sites. Nature. 263, 427, 1976.
- 218 - TOBELEM, G., DROUET, L., CAEN, J. Interactions plaquettes - Paroi vasculaire. Nouv. Presse. Med. 15, 1081, 1980.
- 219 - TODD, A.S. Endothelium and fibrinolysis. Bibl. Anat. 12, 98, 1973.

- 220 - TRAP-JENSEN, J. Permeability of small vessels in diabetes. Acta diabetologica Latina. In : LUNDBACK, K., KEEN, H. (Eds) : Blood vessel disease in diabetes mellitus. V Capri Conférence , 8, 192, '971.
- 221 - TURNER, S.R., TAINER, J.A., LYNN, W.S. Biogenesis of chemotactic molecules by arachidonate lipooxygenase systems of platelets. Nature. 257, 680, 1975.
- 222 - UBATUBA, F.B., MONCADA, S., VANE, J.R. The effect of prostacyclin (PGI₂) on platelet behaviour. Thrombus formation in vivo and bleeding time. Thromb. Haem. 41, 425, 1979.
- 223 - UCHIMURA, I., WAKABAYASHI, T., MASHIMO, N., MAEZAWA, H. Characteristics of human platelet insulin receptor. Proc. Japan. Acad. 54, 490, 1978.
- 224 - VANDERHOEK, J.Y., LANDS, W.E.M. The inhibitor of the fatty acid oxygenase of sheep vesicular gland by antioxydants. Biochim. Biophys. Acta, 296, 382, 1973.
- 225 - VERRY, M., VAINER, H., DECHAVANNE, M. Les anomalies plaquettaires au cours du diabète. Entretiens de Bichat-Thérapeutique. 287, 1974.
- 226 - VERRY, M., BRYON, P.A., DECHAVANNE, M., LAGARDE, M., VAINER, H. Etude des phénomènes biochimiques du métabolisme plaquettaire. La Gliclazide, agent régulateur de la physiologie plaquettaire. J. Pharmacol. Clin. 2, 199, 1975.
- 227 - VIJKARI, J., RUUSKANEN, O., SALMI, T., HALONEN, P. Vascular prostacyclin may be reduced in diabetes in man. Lancet. 10, 325, 1979.
- 228 - WAITZMAN, M.B. Prostaglandins and diabetic retinopathy. Exp. Eye. Res. 16, 307, 1973.
- 229 - WAITZMAN, M.B., COLLEY, A.M., NARDELLI-OLKOWSKA, K. Metabolic approaches to studies on diabetic microangiopathy. Diabetes. 26, 510, 1977.
- 230 - WAITZMAN, M.B. Proposed metabolic dysfunctions in diabetic microthromboses and microangiopathy. Metabolism. 28, 401, 1979.

- 231 - WALSH, P.N. The effects of collagen and Kaolin on the intrinsic coagulant activity of platelets. Evidence for an alternative pathway in intrinsic coagulation not requiring factor XII. *Brit. J. Haemat.* 22, 393, 1972.
- 232 - WASTESON, A., GLIMELIUS, B., BUSCH, C., WESTERMARK, B., HEDLIN, CH., NORLING B. Effect of platelet endoglycosidase on cell surface associated heparan sulfate of human cultured endothelial and glial cells. *Thromb. Res.* 11, 309, 1977.
- 233 - WEKSLER, B.B., MARCUS, A.J., JAFFE, E.A. Synthesis of prostaglandin I_2 (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74, 3922, 1977.
- 234 - WILLIS, A.L., KHUM, O.C. A new potential mediator of arterial thrombosis whose biosynthesis is inhibited by aspirin. *Prostaglandins.* 4, 127, 1973.
- 235 - WILLIS, A.L., COMAI, K., KUHN, D.C., PAULSAUD, J. Dihomo γ -linoleate suppresses platelet aggregation when administered in vitro or in vivo. *Prostaglandins.* 8, 509, 1974.
- 236 - WITTLE, B.J.R., MONCADA, S., VANE, J.R. Comparison of the effects of prostacyclin (PGI_2) prostaglandin E_1 and D_2 on platelet aggregation in different species. *Prostaglandins.* 16, 373, 1978.
- 237 - WOLFE, S.M., SHULMAN, N.R. Adenylcyclase activity in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 265, 1969.
- 238 - WU, K.K., HOAK, J.C. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. *Stroke.* 6, 521, 1975.
- 239 - ZIEVE, P.D., GREENOUGH, W.B. Adenyl cyclase in human platelets activity and responsiveness. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 462, 1969.
- 240 - ZUCKER, W.H., SHERMER, R.W., MASSON, R.G. Ultrastructural comparison of human platelets separated from blood by various means. *Am. J. Pathol.* 77 255, 1974.

